LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA SOUZA

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

**Departamento:
Reprodução Animal**

**Área de Concentração:
Reprodução Animal**

**Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**

**Pirassununga
2004**

LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA SOUZA

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

Pirassununga

2004

LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA SOUZA

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

**Departamento:
Reprodução Animal**

**Área de Concentração:
Reprodução Animal**

**Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**

**Pirassununga
2004**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1393
FMVZ

Souza, Luiz Waldemar de Oliveira

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 / Luiz Waldemar de Oliveira Souza. - São Paulo : L. W. O. Souza, 2004.
183 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Bovinos. 2. Hormônios testiculares. 3. Fator de crescimento.
4. Sêmen animal (características). 5. Hormônios de crescimento.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações hormonais, IGF-1 e IGFBP-3 no plasma seminal em animais submetidos à degeneração testicular", Protocolo nº403/2003, utilizando 16 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of bovine recombinant somatotropin on sperm characteristics, hormone levels, IGF-I and IGFBP-3 on seminal plasma in bulls under testicular degeneration" protocol number 403/2003, utilizing 16 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 17 de dezembro de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Luiz Waldemar de Oliveira Souza

Título: 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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Este documento, fruto de grande esforço que iniciou na conclusão da graduação na Universidade Estadual de Londrina, me faz lembrar e relembrar muitas pessoas que, ao longo de minha vida, fizeram e fazem por merecer esta dedicatória:

Ao nosso Pai Eterno, que se manifesta constantemente através da vida e seus infinitos mistérios, os quais nunca compreenderemos totalmente;

À minha família; meus pais Alice e Odécio, pelo esforço em garantir saúde, educação e cultura; minha irmã Ana e cunhado Paulo por sempre me apoiarem;

À amada Fabiana, pelo amor incondicional, carinho, apoio e companheirismo,

Aos amigos da época de graduação em Londrina: Bryan, Neca, Zero, Pauê e Praga, Foguinho, Fred e Sandra, Dri, Anderson, Xuruca, Zé Rabitto, Carioca, São, Isa, Benjamim, Dennis, Érico, Mônica e Rodrigo, Faria e Andréia, Mancha, Mi e Aninha, Rafinha e Cláudia, Chris; com cada um destes aprendi um pouquinho do que hoje tenho de bom.

Meus sinceros agradecimentos

Ao professor Doutor Rubens Paes de Arruda, pelos ensinamentos, pela paciência, apoio e até pelos puxões de orelha que guiam o aprendizado, e pela imensa dedicação ao trabalho e à busca de critérios na execução destes.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, pelas orientações, sugestões e paciência em todo o processo de estudo e estabelecimento das técnicas a serem utilizadas nas dosagens hormonais;

À Pós-Graduanda Eneiva Carla de Carvalho Celeghini pela colaboração com as análises espermáticas durante todo o período de colheita de amostras, pelo auxílio, sugestões e correções, e pela amizade ao longo de todo o programa de doutorado;

Ao Prof. Dr. Mário Binelli, pelas sugestões, críticas e empréstimo de ótimos livros que me foram extremamente úteis na melhoria da redação e conhecimento;

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues pelo trabalho estatístico, realizado com rigor e pela paciência no esclarecimento de diversas dúvidas a respeito;

Ao Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, pelos inúmeros esclarecimentos sobre os mais diversos assuntos pertinentes ou não a este trabalho;

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, pela disposição em ajudar nos radioimunoensaios;

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira pela colaboração com as dosagens de testosterona, IGF-I e IGFBP-3;

À Érica, técnica do Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH, VRA) pelas determinações de testosterona e IGF-I;

Ao colega Alexandre Rosseto Garcia pela colaboração na condução do projeto conjunto que resultou em nossas duas teses de doutorado;

À colega Dra. Fabiana de Souza pelo superdisposição em me auxiliar na realização de alguns testes preliminares;

Aos estagiários Cláudia “napgirl” Raphael e André “simprão” Furugen pelo trabalho árduo e companheirismo durante todo o período de colheita de amostras;

À Pós-graduanda Juliana Nascimento, pelo auxílio na colheita de amostras durante o período experimental;

Aos demais estagiários que prestaram valioso auxílio, mesmo que por períodos mais curtos: ao Lucas “sonia”, ao Daniel, à simpática “rufião”, ao “pato”, à Simone e Sidney;

Aos funcionários Márcio e João pelo auxílio com a alimentação e manejo dos animais, às funcionárias da faxina que mantinham sempre um café esperando nas manhãs de sono e à secretária Isabel por seus serviços;

Aos colegas da Pós-Graduação de Pirassununga, pela agradável convivência: Kátia “japa” Mizuta e João Barbuio, Adriana Capezzuto, Pauline Martins, Alexandre “menininho” Marques, Rodrigo Forero, “Espeto”, Zé Rodrigo, Gutinho e Gutão, Norma Lúcia de Souza, Vanessa, João Gustavo, Manoel “gaúcho” e também aqueles que, pra variar, esqueci;

Aos colegas da Pós-Graduação de São Paulo pela pouca, mas igualmente agradável convivência: Karina “baiana”, Nélcio, Nani, Paola “baianinha”; Eduardo Antunes e Regina;

E por último, se não faltou mais alguém, aos touros Marvado, Sônia, Magrão, Moleza, Traíra, Perdigueiro, A67, A99, A120, A137, A151, A149, A159, B1A, B23 e B91, pelas poucas cabeçadas, apesar de tantas condições desconfortáveis que lhes foram impostas.

... No decorrer de toda a história da ciência ocidental, o desenvolvimento da biologia caminhou de mãos dadas com o da medicina. Por conseguinte, é natural que, uma vez estabelecida firmemente em biologia a concepção mecanicista da vida, ela dominasse também as atitudes dos médicos em relação à saúde e à doença. ...

Fritjof Capra

RESUMO

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** [Recombinant bovine somatotropin effects on testosterone and IGF1 levels of bulls (*Bos taurus taurus*) under testicular degeneration]. 2004. 81 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

Dentre os diversos fatores que provocam diminuição no desempenho reprodutivo, a degeneração testicular térmica é o motivo mais freqüente de baixa fertilidade em *Bos taurus* no Brasil. Baseados nos efeitos sobre a secreção de hormônios hipofisários e gonadais, o GH vem sendo estudado para o tratamento da infertilidade masculina. Um delineamento experimental tipo blocos ao acaso utilizou dezesseis touros adultos submetidos a 4 tratamentos em esquema fatorial 2x2 (0 e 96 horas de insulação testicular, 0 e 1,2 mg bST/kg PV), com o objetivo de testar os efeitos da bST no tratamento de touros submetidos a insulação testicular. Motilidade, alterações de acrossoma, defeitos de cauda e cabeça, gota protoplasmática proximal e defeitos espermáticos totais aumentaram em consequência da insulação testicular. As concentrações seminais de Testosterona foram temporariamente diminuídas em resposta a insulação testicular. A ocorrência de gota protoplasmática distal, anomalias de peça intermediária e concentrações seminais de IGF1 não foram afetadas pela insulação testicular. A somatotropina recombinante bovina não afetou as características espermáticas ou concentrações seminais de Testosterona e IGF1.

Palavras-chave: Sêmen. Degeneração testicular. Somatotropina. Testosterona. Insulin-like Growth Factor.

ABSTRACT

SOUZA, L.W.O. **Recombinant bovine somatotropin effects on testosterone and IGF1 levels of bulls (*Bos taurus taurus*) under testicular degeneration.** [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]. 2004. 81 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

Testicular heat degeneration is the most common cause of poor fertility of *Bos taurus* bulls in the tropics. The Growth Hormone has been studied in man infertility treatment with some progress. A randomly blocks experimental design used 16 mature bulls allotted in 4 treatments in a 2x2 factorial arrangement (0 e 96 hours of scrotal insulation, 0 e 1,2 mg bST/kg BW) was performed to asses the effects ob bulls submitted to scrotal insulation. Motility, abnormal acrosome, tail and head defects, proximal droplet, and abnormal sperm increased, and seminal plasma Testosterone was temporally increased in response to scrotal insulation. Distal droplet, midpiece and seminal plasma IGF1 were not affected by bST. The bST did not affect sperm characteristics or seminal Testosterone and IGF1.

Key words: Semen. Testicular degeneration. Somatotropin. Testosterone. Insulin-like Growth Factor.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	20
4	HIPÓTESE.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	MORFO-FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO....	25
3.1.1	TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS.....	26
3.1.2	GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS.....	36
3.1.3	PÊNIS.....	38
3.2	PLASMA SEMINAL.....	40
3.3	ESPERMATOGÊNESE.....	41
3.4	ESPERMATOZÓIDE.....	47
3.5	REGULAÇÃO HORMONAL DA FUNÇÃO TESTICULAR.....	49
3.5.1	EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GÔNADAS.....	50
3.5.2	MECANISMOS PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS TESTICULARES.....	56
3.5.3	PRECURSORES E FONTE DOS ANDRÓGENOS TESTICULARES....	57
3.5.4	SÍNTESE DE ANDRÓGENOS PELAS CÉLULAS DE LEYDIG.....	58
3.5.5	TESTOSTERONA.....	60
3.5.4	HORMÔNIO DO CRESCIMENTO.....	65
3.5.7	FATORES REGULADORES DO CRESCIMENTO.....	66
3.5.7.1	INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS.....	67

3.5.7.2	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I.....	68
3.5.7.3	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEINS.....	71
3.5.8	INTERRELAÇÕES ENTRE GH, SISTEMA IGF E TESTOSTERONA...	72
3.6	TERMORREGULAÇÃO.....	73
3.6.1	TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR.....	75
3.7	ESTRESSE TÉRMICO..	78
3.8	DEGENERAÇÃO TESTICULAR PELO CALOR.	79
3.9	INSULAÇÃO ESCROTAL.....	84
3.10	EFEITOS DA SOMATOTROPINA EXÓGENA.....	85
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	89
5.1	ANIMAIS E MANEJO ZOOTÉCNICO.....	91
5.2	DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS AOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS..	91
5.3	TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	93
5.4	DELINEAMENTO E MANEJO EXPERIMENTAL.....	94
5.5	COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN.....	97
5.6	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	97
5.7	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS ESPERMÁTICAS.....	98
5.8	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE TESTOSTERONA.....	99
5.9	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE IGF1.....	100
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	103
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
6.1	INSULAÇÃO TESTICULAR.....	106

6.2	DEFEITOS DE ACROSSOMA.....	109
6.3	GOTA PROTOPLASMÁTICA PROXIMAL.....	115
6.4	GOTA PROTOPLASMÁTICA DISTAL.....	121
6.5	DEFEITOS DE PEÇA INTERMEDIÁRIA.....	126
6.6	ANOMALIAS DA CABEÇA DO ESPERMATOZÓIDE.....	131
6.7	ANOMALIAS DA CAUDA DO ESPERMATOZÓIDE.....	136
6.8	DEFEITOS ESPERMÁTICOS TOTAIS.....	140
6.9	MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	145
6.10	CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA NO PLASMA SEMINAL...	150
6.11	CONCENTRAÇÕES DE IGF1 NO PLASMA SEMINAL.....	156
7	CONCLUSÃO.....	162
	REFERÊNCIAS.....	164
	ANEXOS.....	177

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina possui importante papel enquanto atividade produtiva dentro do contexto econômico nacional como fonte de proteína para a população, matéria prima para a indústria e elemento captador de divisas através das exportações. O desenvolvimento de tecnologias aplicáveis à reprodução animal é, sem dúvida, um meio efetivo de incrementar os índices de produção, aumentando receitas ou empregos diretos e indiretos.

Os recentes dados da produtividade agropecuária, com seus contínuos recordes de produção, são atualmente pontos fundamentais na obtenção de resultados favoráveis na balança comercial brasileira. Não por acaso, no ano de 2003, uma das mais agradáveis notícias veiculadas pela mídia no país foi o fato de o Brasil ter se tornado o maior exportador mundial de carne bovina. Tal produção, incrementada visando a demanda dos mercados internacionais, recebeu impulso significativo com a ocorrência dos casos de encefalopatia espongiforme bovina que abalou o mercado europeu e com o advento do segmento de alimentos orgânicos ou ditos “naturais”. Neste contexto, a pecuária brasileira está muito bem posicionada, considerando-se as características de sua produção (grandes áreas produtivas com criação extensiva a pasto) de forma a apresentar um produto com perfil que se enquadra exatamente dentro das novas exigências do mercado consumidor.

Em sistemas de criação extensiva, a presença física de touros corresponde numericamente a apenas 5% do total de animais. Entretanto, na cadeia produtiva da bovinocultura, um macho é responsável por mais de 70% do melhoramento genético do rebanho. A consequência disto é a aplicação de investimentos consideráveis na melhoria de produtividade dos rebanhos através da aquisição de reprodutores comprovadamente superiores. Entretanto, este valor relacionado com o material

genético está também relacionado com a capacidade de difusão dos genes no rebanho, o que implica em capacidade de fertilizar o maior número possível de fêmeas.

Fertilidade masculina insatisfatória é um dos principais problemas em criação animal, podendo ter impacto significativo sobre o desempenho reprodutivo de um rebanho. Este impacto será maior à medida que se estende a relação entre o número de fêmeas e número de machos, particularmente quando se utiliza a inseminação artificial.

Entre as diversas causas que provocam diminuição no desempenho de reprodutores encontra-se a degeneração testicular, considerada o motivo mais freqüente de baixa fertilidade em machos bovinos no Brasil (VALE FILHO et al., 1974) e que pode ser decorrente de várias situações. Sabe-se hoje que o estresse térmico é a causa mais comum da degeneração testicular em touros (BARTH, 1993).

Estudando a origem de baixa fertilidade e infertilidade em touros, VALE FILHO et al. (1979) observaram que 40,3% dos animais que serviam em rebanhos de criação extensiva apresentavam baixa fertilidade a campo, tendo como causa a degeneração testicular. Embora estes estudos tenham sido realizados há quase três décadas, ainda hoje tal situação persiste, talvez em razão da seleção de animais com base em características que não estão relacionadas com a capacidade de manter íntegra a funcionalidade dos tecidos e células das gônadas. Ademais, a maior resistência aos rigores dos trópicos, característica intrínseca das raças zebuínas, não é observada em touros *Bos taurus taurus*, o que torna estes animais sensíveis às condições ambientais observadas na pecuária brasileira.

É consenso que animais adaptados às condições tropicais apresentam menos problemas relacionados com a termorregulação, como observado por Brito et al. (2002) num estudo em que touros *Bos taurus taurus* tiveram menor produção de sêmen que touros *Bos taurus indicus* e animais cruzados. Neste estudo, observou-se uma correlação negativa entre qualidade do sêmen e temperatura da superfície escrotal.

Touros de qualidade seminal aceitável e atividade reprodutiva satisfatória podem diferir quanto à capacidade de regulação da temperatura testicular. Machos nessas condições, mas que não mantêm um gradiente de temperatura no parênquima testicular, exibem fertilidade reduzida em relação a touros com padrões de temperatura testicular normal. Em termos práticos, a queda no desempenho de touros a campo se reveste de grande importância, visto que a taxa de reprodução é cinco vezes mais importante economicamente que a taxa de crescimento dos animais para os produtores de bovinos de corte (TRENKLE; WILLHAM, 1977).

Em situações onde linhagens de excepcional mérito genético apresentam diminuição da fertilidade, sem que se caracterize um processo hereditário, devem-se considerar procedimentos terapêuticos na tentativa de restabelecer o desempenho reprodutivo. Nestas circunstâncias, o uso de substâncias naturais ou sintéticas, como o Hormônio do Crescimento (GH) ou Somatotropina (ST), pode ser uma alternativa economicamente viável.

Em medicina humana, métodos terapêuticos para sanar a subfertilidade em machos, usando vários hormônios do eixo gonadotrófico, têm mostrado resultados com alguma melhoria das condições clínicas (HOWARDS, 1995). Apesar de não ser considerado um hormônio do eixo gonadotrófico, o tratamento da infertilidade

masculina tornou-se uma nova área na aplicação do GH, com vários estudos enfocando os efeitos farmacológicos da administração deste sobre a secreção de hormônios pituitários e gonadais.

Ao longo de muitos anos, inúmeros pesquisadores procuraram respostas para todos os fatores envolvidos no complexo mecanismo de regulação endócrina que envolvem não só o GH, mas também outras substâncias atuantes no sistema reprodutivo. Apesar de esforços concentrados em todas as partes do mundo, não há, ainda, um consenso sobre os efeitos do GH sobre hormônios como a testosterona, mas já se pode dizer que existe unanimidade sobre a relação entre o hormônio do crescimento e o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (*Insulin-like Growth Factor-I*, IGF1). Sabe-se que este IGF1 é o principal modulador das ações do GH e, neste sentido, talvez seja a chave para se entender os efeitos da somatotropina sobre a reprodução.

Na medicina veterinária, o uso da somatotropina exógena tornou-se realidade com o advento da tecnologia recombinante. O avanço da engenharia genética permitiu a aplicação em escala comercial da somatotropina na produção de carne e leite e, nos últimos 15 anos, muitas pesquisas foram conduzidas para se avaliar os efeitos da ST sobre o ganho de peso e lactação de suínos e bovinos. Agora, cientistas de várias partes do globo buscam respostas para os efeitos resultantes da aplicação de doses suprafisiológicas de ST no sistema reprodutivo dos animais domésticos. Algumas das constatações no sistema reprodutivo masculino, embora ainda exista alguma controvérsia, são aumentos no número de algumas células da linhagem germinativa (SWANLUND et al., 1995) e melhora nos valores de motilidade espermática (GRAVANCE et al., 1997).

Apesar de não haver unanimidade sobre efeitos positivos do GH exógeno sobre a função testicular, os poucos trabalhos já conduzidos foram realizados utilizando-se animais sadios (DEAVER; BRYAN, 1999; SAUERWEIN et al., 2000) como objeto de estudo. O estudo da ação da somatotropina sobre a função reprodutiva em touros que passaram por degeneração testicular nunca foi realizado, principalmente em condições de clima tropical. Do mesmo modo, a observação dos efeitos da temperatura elevada sobre as concentrações hormonais e de fatores de crescimento jamais foi considerada em estudos sobre os efeitos do calor sobre a produção de sêmen em bovinos.

Por outro lado, o fato de o principal mediador das ações do hormônio do crescimento ser IGF1 cria a possibilidade de um presumido efeito terapêutico da somatotropina recombinante ter uma aplicação significativa na recuperação da degeneração testicular, visto que tal fator de crescimento foi considerado de importância para a reparação tecidual (JENNISCHE; SKOTTNER; HANSSON, 1987).

A ausência de tratamentos específicos e comprovadamente eficazes para a degeneração reflete o ainda deficiente conhecimento acerca de todos os fatores envolvidos na fisiopatologia e inter-relações entre os diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos que modulam a função testicular.

2 OBJETIVOS

Considerando a importância do assunto em questão e as informações disponíveis na literatura, o **objetivo geral** desta pesquisa foi verificar se o uso de somatotropina em animais em processo de degeneração testicular é capaz de trazer benefícios significativos à recuperação da normalidade do sistema reprodutivo com base nos seguintes **objetivos específicos**:

- 1) Observar as alterações da motilidade e características morfológicas no sêmen de touros *Bos taurus taurus* antes e após instalação de processo de degeneração testicular induzida;
- 2) Observar as concentrações de T e IGF1 no plasma seminal de touros *Bos taurus taurus* antes e após instalação de processo de degeneração testicular induzida;
- 3) Observar os efeitos da administração de bST sobre a motilidade e características morfológicas no sêmen de touros *Bos taurus taurus* submetidos ao processo de degeneração testicular induzida;
- 4) Observar os efeitos da administração de bST sobre as concentrações de T e IGF1 no plasma seminal de touros *Bos taurus taurus* submetidos ao processo de degeneração testicular induzida;
- 5) Comparar, através do monitoramento da motilidade e características morfológicas do sêmen, a capacidade de recuperação da gametogênese de touros *Bos taurus taurus* em processo de degeneração testicular com e sem tratamento com bST.

O trabalho de pesquisa procurou testar a hipótese de que aplicações subcutâneas de somatotropina recombinante bovina em doses ligeiramente acima daquelas utilizadas na pecuária leiteira seriam capazes de promover melhorias significativas no processo de recuperação celular, tecidual e, portanto, funcional das gônadas de touros *Bos taurus taurus* que passaram por processo de degeneração testicular térmica.

O sucesso da fertilização depende da complexa combinação de fatores relacionados ao ambiente de ocorrência deste fenômeno e das características relacionadas à célula responsável pelo deslocamento desde os túbulos seminíferos até o local de encontro com o óvulo.

A integridade e viabilidade do gameta masculino são resultado da normalidade de seu local de formação e de um meio fisicamente e bioquimicamente adequado para seu armazenamento ou trânsito. A contribuição de cada uma das partes do sistema reprodutivo masculino é indispensável à normalidade física e funcional do espermatozóide.

3.1 MORFO-FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO

O sistema reprodutivo masculino é composto pelos testículos, epidídimos, glândulas acessórias e pênis. Os testículos são responsáveis pela produção de espermatozoides e secreção de andrógenos; os epidídimos constituem um compartimento onde ocorre a maturação e o armazenamento dos espermatozoides; durante o ato sexual, os espermatozoides são expelidos para a uretra onde, juntamente com secreções das várias glândulas acessórias, são dirigidos pelo pênis para o local de deposição do sêmen e início do processo de fecundação.

3.1.1 TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS

As gônadas tornam-se inicialmente aparentes no feto quando as células germinativas primordiais migram do mesênquima embrionário para a crista genital de cada um dos rins embrionários (SETCHELL, 1991), os chamados mesonefrons. A expressão de um gene presente no cromossomo Y induz a gônada embrionária ainda indiferenciada formando a gônada masculina a partir de estruturas que, sem a influência genética, resultariam na formação de ovários (AMMAN; SCHANBACHER, 1983).

Inicialmente, não é possível distinguir os testículos dos ovários, mas após algum tempo, as células germinativas do macho tornam-se rodeadas pelos precursores das células de Sertoli, o primeiro tipo celular a se diferenciar (SHARPE et al., 2003), formando os cordões sexuais primários e fornecendo os elementos que originarão o epitélio seminífero (BYSKOV, 1990; SETCHELL, 1991). Por ocasião da diferenciação do sexo da gônada, o mesonefron encontra-se em involução (SETCHELL, 1991) e os futuros testículos apresentam os epidídimos e ductos deferentes formando-se a partir do chamados ductos mesonefrons. Nos bovinos, como em outros animais domésticos, a *rete testis* desenvolve-se como uma massa separada de cordões celulares indo situar-se centralmente nos testículos, diferentemente do homem (ASHDOWN; HAFEZ; 1995). Toda esta diferenciação morfológica dos testículos é acompanhada por acentuado aumento na capacidade de síntese de andrógenos (BYSKOV, 1990). Este precoce funcionamento dos testículos é fundamental para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos

masculinos porque o embrião masculino apresenta estruturas comuns a ambos os sexos, os ductos e túbulos mesonéfricos e os ductos Mullerianos. Ao mesmo tempo em que as células de Leydig produzem testosterona e estimulam o desenvolvimento dos ductos eferentes, ductos epididimários, ductos deferentes e glândulas vesiculares (AMANN; SCHANBACHER, 1983), as células de Sertoli produzem o Hormônio Anti-Mulleriano, o qual induz a degeneração de potenciais estruturas femininas.

Durante a vida fetal, as células de Sertoli funcionalmente imaturas são proliferativas e, além de permitir a formação dos cordões celulares do epitélio seminífero, impedem as células germinativas de entrarem em meiose e previnem a diferenciação e funcionalidade precoce das células de Leydig (MACKAY, 2000). Do período neonatal até próximo à puberdade, as células de Sertoli ainda são capazes de proliferar e encontram-se imaturas funcionalmente. Por ocasião da puberdade, estas células passam por uma diferenciação morfológica e funcional atingindo um estado de maturidade onde perdem a capacidade proliferativa, formam as junções intercelulares entre células de Sertoli e passam a expressar funções ausentes nas células imaturas do período fetal e neonatal (SHARPE et al., 2003). Este período de maturação nos bovinos encontra-se em uma situação intermediária daquela observada em roedores e humanos, onde há um intervalo de semanas entre os períodos neonatal e peripuberal nos quais dois picos correspondentes de proliferação de células de Sertoli podem ser notados (FRANÇA et al., 2000). O número de células de Sertoli resultante destas duas fases proliferativas determina a quantidade de células germinativas que se formarão através da espermatogênese e,

conseqüentemente, determina numericamente o volume de produção espermática na vida adulta (SHARPE, 1994).

No animal adulto, os testículos localizam-se externamente ao abdômen inseridos em uma estrutura em forma de bolsa (escroto), derivada da pele e fascia da parede abdominal, localizados dentro do processo vaginal o qual, por sua vez, é uma extensão separada do peritônio que passa através da parede abdominal por uma abertura denominada canal inguinal (ASHDOWN; HAFEZ; 1995).

Nos mamíferos domésticos, o suprimento sanguíneo dos testículos é provido pela artéria testicular que se apresenta enrolada em um formato espiral, cuja base repousa sobre o pólo cranial do testículo (HAFEZ, 2004). Estas espirais estão inseridas num emaranhado de veias testiculares chamado plexo pampiniforme, resultando numa estrutura de grande importância para o mecanismo de termorregulação testicular. Outra importante estrutura atuante na regulação da temperatura é a parede escrotal constituída, partindo do exterior para a parte interna, por epiderme, derme, túnica dartos, tecido conjuntivo frouxo, camada parietal do processo vaginal, cavidade do processo vaginal e camada visceral do processo vaginal.

A posição do testículo dentro do escroto e a direção de seu eixo maior em relação ao corpo do animal difere segundo as espécies. Nos bovinos, o eixo maior dos testículos encontra-se numa posição perpendicular ao eixo longitudinal do corpo do animal.

Cada um dos dois testículos encontra-se envolto por uma cápsula resistente, a qual consiste principalmente de tecido fibroso, mas, em algumas espécies, também possui células contráteis envolvidas na movimentação do fluido testicular e

espermatozóides em direção ao epidídimo (SETCHELL, 1991). Este tecido fibromuscular bastante resistente, a túnica albugínea, emite expansões que penetram no parênquima do órgão. Os septos fibrosos da túnica albugínea promovem uma sutil divisão do parênquima testicular em lóbulos contendo túbulos seminíferos contorcidos (ASHDOWN; HAFEZ; 1995) imersos no parênquima testicular. Este parênquima é composto pelos túbulos seminíferos imersos no interstício, o qual compreende tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) contendo nervos e pequenos vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig, além de uma população variável de células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SETCHELL, 1991), entre estas macrófagos e fibroblastos. Segundo Setchell (1991), o tecido intersticial nos bovinos representa cerca de 15% dos testículos onde as células de Leydig compreendem cerca de 7,5% do interstício ou 1% dos tecido testicular.

Os túbulos seminíferos contidos nos lóbulos são estruturas tubulares revestidas internamente por um epitélio formado pelas células da linhagem germinativa e algumas células estruturais e funcionais, entre estas as células de Sertoli. Em suínos, o diâmetro e comprimento tubulares estão correlacionados com o número de células germinativas; respectivamente 0,95 e 0,77 (FRANÇA et al., 2000).

As células de Sertoli ocupam uma posição fundamental para a preservação de condições favoráveis às células presentes nos túbulos seminíferos, por serem o único tipo celular a ter contato com a camada mais externa do epitélio seminífero e com a luz dos túbulos e com todos os outros tipos celulares concomitantemente. Assim, juntamente com a membrana basal, a célula de Sertoli compõe a chamada

barreira hemato-testicular, onde esta célula repousa sua base no tecido limítrofe dos túbulos seminíferos enquanto as espermatogônias situam-se cercadas por duas células de Sertoli adjacentes e as células germinativas em estágio mais avançado de diferenciação como as espermatídes e espermatozóides encontram-se envoltas por profundas criptas citoplasmáticas das células de Sertoli presentes na superfície do lúmen. Entre duas células de Sertoli adjacentes existe uma série de estruturas especializadas, algumas semelhantes a desmossomos contendo “gap junctions”, responsáveis por manter íntimo contato entre as células de Sertoli adjacentes (SETCHELL, 1990). Estas características morfológicas são responsáveis pela manutenção de diferenças nas concentrações dos fluidos presentes no lúmen dos túbulos e na circulação sanguínea e linfática. Estudos com marcadores radioativos demonstraram que moléculas lipossolúveis hidrofóbicas penetram mais rapidamente no interior dos túbulos do que substâncias hidrofílicas (SETCHELL, 1990, SETCHELL, 1991) e que provavelmente exista um sistema de transporte específico para alguns tipos de substâncias como a testosterona (SETCHELL, 1990). Por outro lado, esta barreira restringe a entrada de muitos compostos hidrofílicos pequenos que poderiam ser nocivos às células germinativas, bem como a saída de proteínas produzidas internamente e que poderiam provocar uma reação imune fora dos túbulos seminíferos (GARNER; HAFEZ, 1995).

A membrana basal do epitélio seminífero contém ainda células contráteis mióides (ASHDOWN; HAFEZ; 1995) que também estariam envolvidas no mecanismo seletivo da barreira hemato-testicular (GARNER; HAFEZ, 1995; SETCHELL, 1991).

A composição do fluido testicular é diferente do plasma sanguíneo e do fluido linfático, como resultado da secreção das células de Sertoli e da ação da barreira hemato-testicular. Neste fluido os íons mais abundantes são cloreto, sódio, bicarbonato e potássio e, em menor quantidade, cálcio e magnésio (WITE, 1995). A concentração protéica no fluido testicular é mais baixa do que a do plasma sanguíneo. Porém, os aminoácidos ácido glutâmico, glicina, alanina, serina e ácido aspártico são encontrados em concentrações superiores às do plasma sanguíneo, provavelmente como resultado de síntese local (WITE, 1995). Os hormônios testosterona, dehidroepiandrosterona, 5α -dihidrotestosterona e ainda estrógeno foram encontrados no fluido da *rete testis* de touros e carneiros (WITE, 1995). Há ainda uréia, ácido láctico, ácido ascórbico e glicerilfosforilcolina.

Todos os túbulos contidos nos lóbulos testiculares dirigem sua luz para os túbulos retos, que por sua vez conduzem a *rete testis*. A *rete testis* consiste em um grande tubo posicionado longitudinalmente ao testículo no eixo central dos lóbulos e que promove a ligação entre o final dos túbulos seminíferos (túbulos retos) contidos nos lóbulos e uma série de canais, os ductos eferentes, os quais unem-se para formar um ducto longo e intensamente enovelado que compõe o epidídimo.

Desta forma, os espermatozóides produzidos nos testículos deixam a *rete testis* através dos ductos eferentes em direção ao epidídimo, um órgão fibroso compacto intimamente posicionado à borda posterior ou anterior do testículo. Entre quatro e 14 ductos eferentes unem-se para formar um único ducto epididimário que possui em torno de 80 metros no carneiro (SETCHELL, 1991).

Os epidídimos são anatomicamente divididos em cabeça (segmento inicial), corpo (segmento médio) e cauda (segmento terminal). No bovino, a cabeça do

epidídimo é a porção inicial que consiste em uma estrutura plana posicionada sobre o pólo cranial (proximal) do testículo. O corpo do epidídimo é a porção estreita entre a cabeça e a cauda do epidídimo, esta última visivelmente pronunciada e situada no pólo oposto.

No segmento inicial do epidídimo ocorre uma concentração do fluido oriundo do testículo e o primeiro estágio da maturação espermática. A maturação é completada no segmento médio e os espermatozóides são então armazenados no segmento terminal (AMANN; SHCANBACHER, 1983; SETCHELL, 1991).

Histologicamente o segmento inicial é caracterizado por um epitélio contendo células alongadas, provido de microvilos proeminentes, impropriamente chamados de estereocílios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) que preenchem praticamente todo o lúmen e contém poucos espermatozóides (SETCHELL, 1991). Os segmentos médio e terminal apresentam microvilos curtos e dois tipos celulares (SETCHELL, 1991): a célula prismática é mais comum, apresentando formato alongado e se ocupa toda a espessura do epitélio; o segundo tipo, as células basais, localizam-se próximas à membrana basal do epitélio. As células prismáticas são responsáveis pela fagocitose de restos citoplasmáticos eliminados durante a espermiogênese e que não foram fagocitados pelas células de Sertoli (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). A altura do epitélio diminui progressivamente a partir do segmento inicial em direção ao segmento terminal. Inversamente, a camada muscular lisa que envolve o ducto, a qual está envolvida na ejaculação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999), torna-se mais pronunciada no sentido cabeça-cauda. Nestas circunstâncias, a luz do ducto no segmento médio é relativamente ampla e na cauda a luz é bastante ampla e preenchida com espermatozóides.

A continuação do epidídimo é o chamado ducto deferente, um túbulo reto que segue em direção à uretra. A luz deste compartimento é relativamente estreita e possui parede espessa constituída principalmente por músculo liso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Sua mucosa é pregueada, revestida por um epitélio contendo células prismáticas com estereocílios.

O suprimento sanguíneo da cabeça e do corpo do epidídimo origina-se da artéria testicular, no cordão espermático, enquanto a cauda do epidídimo é suprida pela artéria deferente. Diferenças na anatomia microvascular entre os segmentos estão provavelmente ligadas às suas funções. Os capilares do segmento inicial são do tipo fenestrado (SETCHELL, 1991), diferentemente daqueles encontrados nos testículos e nos outros segmentos do epidídimo. Ao longo do ducto deferente correm vasos que entram e saem testículo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O epidídimo possui abundante inervação adrenérgica e colinérgica, particularmente naquelas áreas com musculatura lisa bem desenvolvida. De forma similar, o ducto deferente possui extensa inervação (SETCHELL, 1991).

Segundo Setchell (1991), nos bovinos e outros mamíferos domésticos, o fluido da *rete testis* que chega ao epidídimo apresenta um espermatócrito¹ de aproximadamente 1% (cerca de 1×10^8 espermatozóides/mL), aumentando para aproximadamente 40% (4×10^9 espermatozóides/mL) no segmento terminal. Isto ocorre porque boa parte do fluido que deixa os testículos é absorvido no segmento inicial do epidídimo (AMANN; SCHANBACHER, 1983). No ejaculado, o

¹ Espermatócrito é o volume ocupado por células, em porcentagem, após centrifugação a 3.000 g por 15 minutos.

espermatócrito volta a apresentar valores abaixo de 10%, provavelmente devido à adição de secreções das glândulas sexuais acessórias.

Esta absorção de fluido no trajeto pelo epidídimo está ligada provavelmente ao transporte de cloreto de sódio (SETCHELL, 1991). As concentrações de sódio no fluido da *rete testis* apresentam valores bem acima de 100 mM/L. Estas concentrações decrescem nos segmentos médio e terminal, apresentando valores em torno de 70 e 40 mM/L, respectivamente. As concentrações de cloretos, inicialmente maiores que 100 mM/L sofrem redução para valores próximos de 60-70 mM/L nos segmentos inicial e médio, atingindo valor próximo a 10 mM/L no segmento terminal do epidídimo. No ejaculado, as concentrações de ambos íons sofrem novo aumento para valores em torno de 100 e 50 mM/L de sódio e cloretos, respectivamente. A concentração de potássio, bem como a relação potássio / sódio, aumenta no fluido dos segmentos inicial e médio do epidídimo em relação ao fluido da *rete testis*. No ejaculado tais valores sofrem alguma redução permanecendo, no entanto, acima daqueles encontrados no fluido da *rete testis*.

Não há citações sobre a presença de glicose no fluido presente no epidídimo de bovinos, mas SETCHELL (1991) afirma haver maior concentração de inositol neste fluido em relação ao sangue, principalmente na cabeça do epidídimo. O inositol é um açúcar não-redutor encontrado em maiores quantidades no sêmen de suínos do que em bovinos (STABENFELDT; EDQVIST; 1996), existindo a possibilidade da conversão deste em frutose para uso como fonte de energia. Contudo, o metabolismo dos espermatozóides no epidídimo é relativamente baixo em razão da pequena quantidade de substrato oxidável presente e pelo caráter

inibitório das concentrações de potássio consideradas altas (STABENFELDT; EDQVIST; 1996).

A carnitina é outra substância encontrada no fluido epididimário (JEULIN; LEWIN, 1996; SETCHELL, 1991), a qual é retirada da circulação sanguínea pelas células epiteliais na forma de L-carnitina livre e secretada para o lúmen do epidídimo. O papel deste composto estaria ligado ao metabolismo do movimento flagelar do espermatozóide.

O fluido epididimário apresenta ainda vários aminoácidos, especialmente ácido glutâmico, glutamina, asparagina e taurina. Várias proteínas específicas andrógeno-dependentes são secretadas no fluido epididimário (SETCHELL, 1991) e estão possivelmente implicadas no processo de maturação funcional do espermatozóide. O perfil eletroforético das proteínas dos fluidos presentes nos diferentes segmentos do epidídimo confirma esta capacidade secretória do epitélio epididimário. Variações na quantidade e na presença de determinadas proteínas presentes nos fluidos do segmento inicial e terminal do epidídimo (SHABANOWITZ; KILLIAN, 1987) podem representar adição, remoção ou modificação das mesmas durante o trânsito do fluido oriundo da *rete testis* através do epidídimo. Aquelas proteínas observadas somente no fluido do segmento terminal do epidídimo podem ter origem em várias fontes, incluindo a secreção do epitélio ou transporte a partir da circulação sanguínea. De fato, várias proteínas do fluido da cauda do epidídimo parecem estar também presentes no plasma sanguíneo, conforme verificaram Shabanowitz e Killian (1987). Algumas enzimas como a transaminase glutâmico-oxalacética e a transaminase glutâmico-pirúvica são encontradas no fluido epididimário (WITE, 1995).

3.1.2 GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS

Uma série de glândulas componentes do sistema reprodutivo masculino libera seu conteúdo tanto para o interior dos ductos deferentes, como próximo à sua extremidade na porção pélvica da uretra, onde, por ocasião da ejaculação, são misturadas com a suspensão fluida de espermatozóides (ROSENBERGER, 1983).

Estas glândulas sexuais acessórias variam consideravelmente entre os mamíferos, com relação à sua localização topográfica, tamanho, morfologia e funções (AÜMULLER; SEITZ, 1990); variações estas que podem refletir diferenças nos hábitos sexuais e ambientes originais das espécies animais.

Situadas dorsalmente na extremidade caudal da uretra pélvica, as glândulas de Cowper ou bulbouretrais têm o nome originado de sua anatomia; são duas glândulas compactas presentes em touro, garanhão e carneiro, completamente revestidas pelo músculo bulboesponjoso (WITE, 1995). Devido ao fato de serem recobertas por esta espessa camada de músculo estriado (ROSENBERGER, 1983), normalmente não podem ser evidenciadas através de palpação retal. A secreção produzida por estas glândulas é importante na remoção de urina presente na uretra (WITE, 1995). Assim, em bovinos, o gotejamento do prepúcio que precede a monta ou eletroejaculação resulta da secreção bulbouretral. Nos suínos, as glândulas bulbouretrais são responsáveis pela secreção viscosa que produz a fração gelatinosa do sêmen.

Pode-se considerar que a próstata dos bovinos seja constituída de duas porções: uma porção lobulada externa bastante distinta, também conhecida como

corpo da próstata, de pequena dimensão; e a segunda parte interna disseminada (*pars disseminata*) que circunda a uretra pélvica estende-se caudalmente (ROSENBERGER, 1983; WITE, 1995). O corpo da glândula prostática pode ser sentido através da parede do reto do touro, mas sua parte disseminada não pode ser palpada. O corpo rodeia a parte pélvica da uretra e é sentido como uma estrutura volumosa semelhante a um gancho (ROSENBERGER, 1983), logo atrás das vesículas seminais. O tamanho normal do corpo prostático é 1,0 a 1,5 cm de espessura (dorsoventralmente), 3 a 4 cm de comprimento (de um lado a outro) e 1 cm de largura (da frente para trás). A consistência normal é tensa, firme e elástica; a superfície é lisa. Suas secreções são dos tipos merócrina e apócrina (WITE, 1995), ricas em enzimas glicolíticas e lisossômicas (incluindo proteinases, fosfatases e glicosidases), nucleases, nucleotidases. Muitas partículas encontradas no ejaculado ou na secreção prostática como corpos lipídicos e células prostáticas são resultantes da secreção apócrina (WITE, 1995). Em algumas espécies o pH é ligeiramente ácido com altas concentrações de zinco, além de frutose e ácido cítrico. A contribuição da secreção prostática ao volume ejaculado final é pequena em virtude do grande desenvolvimento das outras glândulas acessórias (WITE, 1995).

As vesículas seminais são fáceis de localizar através da parede do reto: estão situadas lateralmente às porções terminais de cada ducto deferente. A primeira estrutura encontrada é o músculo uretral (músculo estriado), repousando na linha média, no assoalho da pelve. Estas glândulas formam uma estrutura em forma de “Y” para frente e de cada lado do músculo uretral. Possuem formato compacto e lobulado nos ruminantes (ASHDOWN; HAFEZ; 1995), com tamanho variando segundo a idade do animal: 7 a 9 cm de comprimento e 1,5 a 2 cm de largura

(comprimento e espessura de um dedo) em touros de um ano e 10 a 15 cm de comprimento, 2 a 3 cm de espessura e 3 a 7 cm de largura máxima em touros de cinco anos (ROSENBERGER, 1983). Comparada ao fluido prostático, a secreção da vesícula seminal é mais alcalina e apresenta maiores concentrações de potássio, bicarbonato e proteína (WITE, 1995). A principal característica desta secreção é a grande presença de açúcares redutores e ácido ascórbico (SETCHELL, 1991). O fluido vesicular apresenta ainda grandes quantidades de frutose e, em menor quantidade, frutose e sorbitol, respectivamente o precursor e um intermediário da conversão em frutose que ocorre na glândula (WITE, 1995). As secreções das vesículas seminais apresentam ainda concentrações de prostaglandinas menores que 100 ng/mL.

Em algumas espécies, o segmento terminal do canal deferente torna-se mais espesso devido à presença de glândulas em sua parede, formando a ampola que, nos bovinos apresenta certa quantidade de frutose (WITE, 1995) e ácido cítrico (SETCHELL, 1991).

3.1.3 PÊNIS

A porção inicial do pênis dos bovinos, junto ao arco isquiático, é composta por uma ampliação do corpo esponjoso do pênis, recoberto por musculatura estriada, o músculo bulbo-esponjoso (HAFEZ; 2004). A uretra peniana encontra-se circundada por este corpo esponjoso. Dois pedúnculos originados no arco isquiático e

recobertos pelo músculo ísquio-cavernoso formam o corpo cavernoso do pênis, dirigindo-se dorsalmente para o ápice do pênis. No interior do corpo cavernoso, em sua porção mais proximal, situa-se o canal dorsal de ereção. Logo após a flexura sigmóide podem-se observar dois canais ventro-laterais de ereção.

Os corpos cavernoso e esponjoso são recobertos pela túnica albugínea do pênis, constituída por uma espessa camada de tecido colágeno.

No trajeto do pênis, de sua base para o ápice, existe uma curvatura chamada flexura sigmóide (STABENFELDT; EDQVIST, 1996) que, sob controle de um par de músculos lisos (músculos retratores do pênis) originados da porção sacral ou coccígea da coluna vertebral, é capaz de controlar o comprimento efetivo do órgão. Na flexura sigmóide, cujo nome origina-se de seu formato em “S”, pode-se visualizar uma curvatura proximal (mais próxima à base do pênis) e uma curvatura distal. O pênis apresenta seu ápice no corpo esponjoso da glândula, onde fica o processo uretral com o orifício uretral. Esta parte do pênis fica inserida no prepúcio peniano, quando em repouso, o qual continua adiante com o nome de prepúcio pré-peniano em sua porção final.

No touro, os corpos cavernosos apresentam pequenos espaços de modo que a ereção resulta de influxo relativamente pequeno de sangue local, com exceção dos pedúnculos e da curvatura distal da flexura sigmóide (HAFEZ; 2004). O corpo esponjoso, apesar de possuir grandes espaços cavernosos, apresenta distensão limitada pela túnica albugínea. O estímulo sexual provoca a dilatação de artérias que suprem os corpos cavernosos do pênis e o músculo ísquio-cavernoso bombeia sangue dos pedúnculos para o restante dos corpos cavernosos através dos canais de ereção. A grande pressão que o sangue exerce nos corpos cavernosos resulta na

dilatação destas estruturas, eliminando a flexão da flexura sigmóide ao mesmo tempo em que há relaxamento dos músculos retratores (STABENFELDT; EDQVIST, 1996). O resultado é um aumento considerável no comprimento do pênis com pequena dilatação do mesmo.

3.2 PLASMA SEMINAL

O conjunto das secreções testiculares, dos epidídimos e das glândulas sexuais acessórias constitui o chamado plasma seminal o qual nada mais é do que a porção fluida do sêmen após a retirada dos espermatozóides.

Embora o fluido produzido nos testículos constitua a fração primordial do plasma seminal, este representa apenas uma diminuta porção do fluido. Durante a ejaculação resultante da monta natural, as glândulas acessórias de bovinos e ovinos liberam suas secreções rapidamente, de forma homogênea, resultando numa completa mistura dos diferentes componentes do plasma seminal. O volume e a composição deste plasma variam consideravelmente entre as espécies, oscilando geralmente entre 5 e 10 mL no touro.

O plasma seminal bovino é um fluido isotônico com pH médio de 6,9 (WITE, 1995), o qual apresenta muitos compostos que não estão presentes em outras partes do organismo em concentrações tão elevadas como a frutose, o ácido cítrico. Além do sorbitol e da glicerilfosforilcolina, a frutose também é utilizada como fonte energética pelo espermatozóide (WITE, 1995). No caso da glicerilfosforilcolina, não

há utilização direta do composto, mas, em algumas espécies como a ovina, secreções do aparelho genital feminino são capazes de promover sua degradação a fosfoglicerol que será então utilizado pelas células espermáticas (WITE, 1995). Nos touros pode ocorrer a presença de quantidade de riboflavina suficientemente grande para produzir uma coloração amarela. A principal fração lipídica é constituída por fosfolipídio, ocorrendo ainda a presença de colesterol, diglicerídeos e triglicerídeos (SETCHELL, 1991). Os íons presentes são o sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloreto; a concentração de proteína é maior entre os mamíferos domésticos (3-8 g/ 100 mL); além destas substâncias, são encontrados também inositol; aminoácidos; prostaglandinas (STABENFELDT; EDQVIST, 1996), e enzimas como a desidrogenase láctica, transaminase glutâmico-oxalacética e transaminase glutâmico-pirúvica (WITE, 1995).

Apesar de não ser essencial a presença do plasma seminal em condições experimentais de inseminação artificial, este fluido serve como um meio de proteção, nutrição e transporte ao espermatozóide em condições de monta natural, podendo ainda promover a diluição das células altamente concentradas no fluido epididimário.

3.3 ESPERMATOGÊNESE

A origem dos espermatozoides está nas células germinativas primordiais, diplóides, encontradas nos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento. Em humanos, estas células podem ser observadas num embrião de apenas 24 horas

(BYSKOV, 1990), no epitélio do endoderma dorsal do saco vitelínico. A partir deste local, conforme o embrião evolui, tais células migram para as gônadas primordiais, as quais originarão os ovários, na fêmea, e os testículos, no macho.

Após a diferenciação morfológica das gônadas em testículos, os tipos celulares presentes, inicialmente chamados pró-espermatogônias e em seguida espermatogônias, passam por divisões mitóticas e meióticas. Ao contrário das fêmeas, indivíduos do sexo masculino mantêm “armazenada” uma população celular em constante processo de mitose ao longo da vida adulta (BYSKOV, 1990). Durante a segunda metade da vida fetal, ocorre a degeneração de um número considerável de células germinativas aparentemente coincidindo com o início das divisões meióticas, mas a razão para tal evento é ainda desconhecida. No macho, as divisões reducionais das células germinativas que levam à formação do espermatozóide, haplóide, normalmente não se iniciam antes da puberdade.

Postula-se que o que determina o início ou não do processo de meiose é a concentração relativa local de duas substâncias secretadas pelos testículos imaturos e maduros, a Substância Indutora de Meiose (MIS) e a Substância de Prevenção à Meiose (MPS), as quais obviamente possuem efeitos opostos (BYSKOV, 1990).

A espermatogênese pode ser definida como um processo de divisão, diferenciação e maturação celular, mediado por hormônios e outras substâncias, pelo qual os espermatozóides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos. Ao longo deste processo, diferentes tipos e subtipos celulares podem ser observados, os quais sofrem transformações enquanto dirigem-se à luz dos túbulos:

1. As espermatogônias são encontradas junto à membrana basal dos túbulos seminíferos. Possuem núcleo arredondado que aparecem como uma

camada irregular bem dentro do tecido conjuntivo circundante (ASHDOWN; HAFEZ, 1995). Seus núcleos podem ser reconhecidos pelo pequeno tamanho e coloração escura devido à presença de grande número de grânulos de cromatina. Sua função é dividir-se (mitose) para produzir outras células da linhagem ao longo da vida adulta do indivíduo e repovoar o testículo em casos de danos às células germinativas mais avançadas (JOHNSON, 1991). Apesar de haver uma diferença numérica entre as espécies, podem-se descrever principais 5 subtipos de espermatogônias: A1, A2, A3, B1 e B2. As diferenças entre estes subtipos devem-se a alterações nos cromossomos, que são longos nas espermatogônias do tipo A e mais curtos nas do tipo B (JOHNSON, 1991);

2. Os espermatócitos primários, resultantes da divisão mitótica de espermatogônias B2, estão localizados no interior de uma camada irregular de espermatogônias e células de Sertoli. Os núcleos são visivelmente maiores que os das espermatogônias (ASHDOWN; HAFEZ, 1995) apresentam coloração mais clara, embora contenham ainda uma quantidade considerável de cromatina granular. Os diferentes subtipos de espermatócitos primários encontram-se em fases de pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno (inicial e final) e diplóteno (JOHNSON, 1991);

3. A primeira divisão meiótica resulta na formação dos espermatócitos secundários, células haplóides com núcleos esféricos e flocos de cromatina de diferentes tamanhos (JOHNSON, 1991). Os espermatócitos secundários e os tipos celulares intermediários entre estes e os espermatócitos primários são de difícil visualização em razão da curta duração destes estágios de maturação (ASHDOWN; HAFEZ, 1995);

4. Após a segunda divisão meiótica surgem as espermatídes, as quais estão localizadas mais internamente nos túbulos seminíferos em relação aos espermatócitos primários. Inicialmente são células pequenas e arredondadas com núcleos de coloração clara em camadas de constituídas de várias células sobrepostas (ASHDOWN; HAFEZ, 1995). Nos estágios finais de seu desenvolvimento, estas células possuem uma cabeça aerodinâmica contendo enzimas e um núcleo condensado contendo o genoma masculino (JOHNSON, 1991);

5. Os espermatozóides situam-se ao longo do limite da luz do compartimento que contêm os tipos celulares (túbulos seminíferos); suas longas caudas estendem-se para dentro da cavidade como estruturas filamentosas e suas cabeças aparecem como pequenos pontos corados de negro ou como linhas curtas (ASHDOWN; HAFEZ, 1995). As cabeças espermáticas estão alojadas em profundos recortes denteados da superfície da célula de Sertoli, porém nunca realmente dentro do citoplasma. O genoma masculino é carregado em seu núcleo condensado.

Espermatogônias, espermatócitos e espermatídes em mesmo estágio de desenvolvimento são ligados entre si através de pontes intercelulares (sincício) que facilitam a sincronia no desenvolvimento ou degeneração, a diferenciação de espermatídes haplóides e a fagocitose e digestão dos corpos residuais na etapa final da espermatogênese (JOHNSON, 1991).

Outros tipos celulares presentes, apesar de não serem da linhagem germinativa, são imprescindíveis à espermatogênese por desempenharem funções essenciais ao processo de diferenciação:

1. As células de Sertoli são grandes e relativamente claras, com exceção do nucléolo proeminente e corado de negro (ASHDOWN; HAFEZ, 1995); seu citoplasma é difuso e seus limites são indefinidos. Segundo Johnson (1991), esta célula possui funções de importância crítica ao desenvolvimento da célula germinativa durante a espermatogênese: (a) suporte estrutural e nutrição; (b) propiciar a espermição das espermatídes maduras, a movimentação de células germinativas jovens; (c) permitir a fagocitose de células degenerativas e corpos celulares residuais liberados pelos espermatozóides formados; (d) secreção de fluido luminal e proteínas; (e) formação da barreira hemato-testicular; (f) promover a comunicação entre as células locais. Sem o suporte físico e metabólico das células de Sertoli, não ocorre a diferenciação das células germinativas, a meiose e a transformação em espermatozóide (SHARPE et al., 2003);

2. A função mais expressiva e conhecida das células de Leydig é dar suporte à espermatogênese através da produção de altas concentrações de testosterona próximo aos túbulos seminíferos. De acordo com Johnson (1991), a produção espermática diária está positivamente correlacionada com o número de células de Leydig. A célula é encontrada no tecido intersticial, o espaço situado entre os túbulos seminíferos, onde também são observados macrófagos, vasos linfáticos e venosos, capilares e tecido conectivo (SETCHELL, 1990). Este tipo celular normalmente apresenta abundância de retículo endoplasmático liso (JOHNSON, 1991), onde o colesterol é sintetizado e a pregnenolona é rapidamente transformada em testosterona, além de grande quantidade de mitocôndrias;

3. Também conhecidas como células peritubulares, as células mióides constituem o componente celular do tecido limítrofe que circunda o epitélio

seminífero formando, juntamente com um material não-celular, uma espécie de membrana basal (SETCHELL, 1990). Diferentemente do homem, as espécies domésticas apresentam uma camada única de células contendo filamentos citoplasmáticos finos, os quais acredita-se serem actina, e que provavelmente são responsáveis nos movimentos de contrações rítmicas dos túbulos seminíferos (JOHNSON, 1991). Tais movimentos auxiliam na propulsão do fluido dos túbulos seminíferos e dos espermatozóides ao longo dos túbulos, em direção a *rete testis*. Além desta importante função, as células mióides participam da manutenção da integridade tubular e secretam substâncias capazes de alterar as funções das células de Sertoli (JOHNSON, 1991).

A duração da espermatogênese na maioria das espécies é semelhante e compreende três fases (JOHNSON, 1991) apresentadas a seguir, segundo a seqüência natural de ocorrência:

1. Espermatocitogênese – processo onde as espermatogônias (diplóides) passam por meiose resultando nos espermatócitos primários ou outras células de sua linhagem;
2. Meiose – fase de divisão pela qual o espermatócito secundário é transformado em espermatogônia (haplóide);
3. Espermio gênese – processo onde é a diferenciação morfológica da espermátide, a qual passa de célula esférica, aflagelada, para uma célula alongada, flagelada, o espermatozóide.

3.4 ESPERMATOZÓIDE

A primeira referência feita ao espermatozóide data de 300 anos atrás quando, no entanto, não havia conhecimento sobre sua natureza e função. Seu descobridor, Leeuwenhoek descreveu apenas a presença no sêmen de um organismo contendo uma cabeça e uma cauda dotada de motilidade (SETCHELL, 1990).

O formato da cabeça e as dimensões do espermatozóide variam segundo a espécie. Nos bovinos, a cabeça possui forma achatada semelhante à uma raquete de tênis. Esta estrutura consiste em uma massa condensada de DNA, a cromatina, combinada com pequenas proteínas conhecidas como protaminas (JOHNSON, 1991). A cromatina é estabilizada por ligações dissulfeto, as quais persistem até o momento da fertilização do óvulo (SETCHELL, 1990).

Recobrando até 2/3 da porção anterior da cabeça (GARNER; HAFEZ, 1995), há o acrossoma, uma estrutura vesicular contendo enzimas hidrolíticas tais como a hialuronidase e acrosina, entre outras, responsáveis pela penetração do espermatozóide no óvulo (JOHNSON, 1991). Entre o acrossoma e o envelope nuclear existe o espaço sub-acrossomal (SETCHELL, 1990), de forma que o acrossoma possui uma membrana acrossomal interna e outra externa, sem haver contato direto entre a membrana interna e a membrana que circunda o núcleo. Ainda na cabeça, na parte imediatamente posterior ao acrossoma, existe uma estrutura conhecida por lâmina densa pós-acrossomal ou bainha pós-acrossomal, onde ocorre a fixação e fusão plasmática do espermatozóide com o óvulo (SETCHELL, 1990).

A membrana citoplasmática recobre todo o espermatozóide, incluindo o acrossoma e a cauda. No momento da fertilização, a membrana acrossomal externa funde-se à membrana citoplasmática para descarregar seu conteúdo durante a chamada reação acrossômica (JOHNSON, 1991).

Posteriormente ao núcleo há uma estrutura especializada na forma de uma fossa de implantação em uma região conhecida como colo (GARNER; HAFEZ, 1995; SETCHELL, 1990) onde é conectada a cauda do espermatozóide.

A cauda ou flagelo do espermatozóide é constituída por três partes: peça intermediária, peça principal e peça terminal (GARNER; HAFEZ, 1995). Na porção proximal da peça intermediária, chamada peça conectora, encontra-se o centríolo proximal. Entre este e a fossa de implantação, fica uma estrutura composta por várias fibras que promove a articulação entre o flagelo e o núcleo na fossa de implantação conhecida como *capitulum* (SETCHELL, 1990). Estendendo-se caudalmente, o *capitulum* passa a se chamar peça conectora, no interior da qual encontra-se o axonema, composto por dois microtúbulos centrais circundados por nove pares de centríolos (JOHNSON, 1991). Recobrindo todas estas estruturas encontra-se uma espiral de mitocôndrias. A peça intermediária estende-se do ponto de união com a cabeça espermática (colo) até o final da hélice mitocondrial. Na peça principal, desaparece a hélice mitocondrial, mas há continuidade dos filamentos do axonema e das fibras mais externas presentes na peça conectora, recoberta por uma bainha fibrosa fenestrada (SETCHELL, 1990). A peça terminal consiste apenas dos nove pares de microtúbulos circundando os microtúbulos centrais, recobertos pela membrana plasmática (GARNER; HAFEZ, 1995; SETCHELL, 1990).

3.5 REGULAÇÃO HORMONAL DA FUNÇÃO TESTICULAR

A reprodução animal exige a disponibilidade de um número suficiente de espermatozóides com motilidade adequada e alta capacidade para fertilizar. Estes dois fatores dependem não exclusivamente, mas crucialmente, do funcionamento adequado de um sistema responsável por uma série de substâncias que regulam de forma complexa as diversas atividades ligadas à reprodução, compreendendo desde a diferenciação e maturação de tecidos e células envolvidos até o comportamento sexual e libido.

Responsável pela produção e secreção hormonal nos mamíferos, o sistema endócrino compreende principalmente partes do sistema nervoso (hipotálamo e neurohipófise) e as glândulas endócrinas (adenohipófise, tireóide, paratireóide, adrenais e gônadas). As glândulas endócrinas sintetizam e armazenam, ao menos em parte, os hormônios para posterior liberação na corrente sanguínea. Estes dois eventos ocorrem em células especializadas que compõem tais glândulas, como no caso dos testículos, ou em porções glandulares anatomicamente distintas das glândulas, como nos casos da adenohipófise e adrenais (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991).

As células constituintes destas estruturas sintetizam mensageiros químicos chamados hormônios, os quais transportam e fornecem informações entre diferentes populações celulares do organismo. Os hormônios exercem efeitos únicos ou múltiplos sobre células-alvo, as quais contêm mensageiros secundários, internos, que ativam os mecanismos nucleares de síntese protéica. Portanto, o sistema

endócrino é composto essencialmente de emissores e receptores, com mecanismos de *feedback* através de mensageiros especializados, os hormônios.

A classificação dos hormônios é feita em referência ao órgão de origem ou sua composição química. Assim, os hormônios esteróides pertencem ao grupo relacionado com os lipídios, enquanto os hormônios peptídicos e protéicos pertencem ao grupo de hormônios nitrogenados (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991).

Enquanto os hormônios peptídicos circulam livremente, sem carreadores, na circulação sanguínea, os esteróides e alguns hormônios protéicos ligam-se a proteínas transportadoras, denominadas carreadores. Ruckebusch, Phaneuf e Dunlop (1991) afirmam que existe um balanço entre o hormônio ligado e o livre, mas somente os hormônios livres são fisiologicamente ativos.

3.5.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GÔNADAS

O grupo de substâncias conhecidas como gonadotrofinas, cujas secreções são reguladas pelo sistema nervoso central, compõem parte do sistema que estabelece a comunicação entre o eixo hipotálamo-hipófise e as gônadas.

Na espécie humana, o hipotálamo situa-se na base do cérebro, centralmente aos elementos que compõem o chamado sistema límbico (GUYTON; HALL, 1997). Considerado por Stabenfeldt (1993) como o principal local de integração entre o sistema nervoso e o endócrino, o hipotálamo é uma área do diencefalo que forma o

assoalho do terceiro ventrículo e inclui o quiasma óptico, a tuberosidade cinérea, os corpos mamilares e a eminência média. Duas porções anatômicas constituídas pelo prolongamento do hipotálamo, o infundíbulo e a neurohipófise, estabelecem conexão entre o hipotálamo e a hipófise (STABENFELDT, 1993).

A hipófise, ou pituitária, é uma glândula com cerca de 1 cm de diâmetro localizada na base do cérebro e unida ao hipotálamo através da haste hipofisária. Segundo sua ação fisiológica, tal glândula é dividida em principalmente em duas porções de diferente origem: a neurohipófise e a adenohipófise. A neurohipófise, ou hipófise posterior possui células gliais formando um tecido neural, enquanto a hipófise anterior (adenohipófise) possui células epitelióides (GUYTON; HALL, 1997). Uma terceira região avascular, conhecida como *pars intermedia*, situa-se entre as duas porções principais da hipófise, sendo bem mais desenvolvida em outras espécies que não a humana.

O hipotálamo produz peptídeos e aminas que estimulam ou inibem a hipófise a produzir: (a) hormônios tróficos (como o Hormônio Luteinizante) que por sua vez influenciam a secreção em tecidos endócrinos periféricos (como o corpo lúteo); (b) hormônios que exercem efeito biológico direto sobre os tecidos (como no caso da Prolactina).

A estimulação de certas áreas do hipotálamo resulta na secreção de hormônios endócrinos pela hipófise anterior a qual recebe suprimento sanguíneo a partir do sangue que flui da porção inferior do hipotálamo para seus seios vasculares (GUYTON; HALL, 1997). À medida que o sangue corre através do hipotálamo, antes de atingir a hipófise anterior, hormônios de liberação e inibição são secretados no sangue por vários núcleos hipotalâmicos. Tais hormônios são transportados no

sangue para a adenohipófise através dos vasos porta-hipotalâmicos-hipofisários, onde agirão sobre as células glandulares hipofisárias controlando sua secreção. Os produtos da secreção hipofisária, uma vez liberados na circulação sanguínea atingirão as células-alvo em diversos tecidos do organismo culminando com uma resposta local dependente do tipo de hormônio hipofisário liberado.

O funcionamento dos testículos é dependente dos estímulos exercidos pelo Hormônio Luteinizante (LH) e pelo Hormônio Folículo Estimulante (FSH), os quais, por sua vez, têm sua secreção hipofisária estimulada pelo Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) secretado pelo hipotálamo em consequência de estimulação química ou nervosa. Além do GnRH, o hipotálamo é também o local de secreção do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH) e do Hormônio Inibidor do Hormônio do Crescimento (GHIH), os quais estimulam ou inibem a secreção de GH pela adenohipófise, respectivamente.

Neurotransmissores no sistema nervoso central controlam a ação do GnRH, o qual é secretado em pulsos com intervalos de 90 minutos (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991). O GnRH então se liga a receptores protéicos na membrana plasmática das células gonadotróficas da hipófise e promovem secreção episódica normal de LH (em torno de 16 pulsos num período de 24 horas) e FSH numa liberação gradual e lenta. O padrão de secreção do FSH e sua baixa taxa de remoção da circulação sanguínea fazem com que as alterações nas concentrações plasmáticas do hormônio sejam mais suaves (AMANN; SCHANBACHER, 1983) do que aquelas observadas para o LH.

Enquanto o LH estimula a secreção de testosterona pelas células de Leydig sendo, portanto, essencial na espermatogênese, o FSH atua principalmente no

desenvolvimento dos testículos antes da puberdade (McLACHLAN et al., 1996). Esta ação se dá através da ligação do FSH com as células de Sertoli, estimulando a produção do hormônio peptídico inhibina (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991), o qual induz a maturação e crescimento das células dos túbulos seminíferos, além da aromatização de andrógenos em estradiol. Em algumas espécies como o rato, porco e carneiro, o FSH também promove a secreção de *androgen binding protein* (ABP, 90 kDa), proteína que se liga à testosterona presente no fluido seminal, inibindo sua absorção pelas células da parede dos ductos e garantindo o aporte de quantidade suficiente do esteróide ao epidídimo.

O eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular constitui um sistema de “alça fechada”, onde o controle de sua ação depende da intensidade de sua secreção. Este sistema apresenta um mecanismo de *feedback* negativo no qual os hormônios testiculares, testosterona e inhibina, deprimem a secreção de LH e FSH pela adenohipófise (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991). A eliminação de todos os tipos celulares, através de castração, por exemplo, promove aumentos nas concentrações de LH e FSH na circulação sanguínea, enquanto a ausência seletiva de tipos celulares promove a elevação de somente FSH. O *feedback* negativo da testosterona sobre o GnRH hipotalâmico constitui o regulador primário da secreção das gonadotrofinas, enquanto a inhibina bloqueia a secreção principalmente de FSH. A testosterona reduz a frequência e amplitude dos pulsos de LH e inibe a secreção de GnRH para o sistema portal hipotalâmico-hipofisário (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991).

Os hormônios e as inter-relações entre eles são responsáveis, já na vida neonatal, pela fertilidade do sêmen do animal adulto. Participam de forma importante

na capacidade espermatogênica através da determinação do número de células de Sertoli nas gônadas, particularmente o FSH e os hormônios tireoidianos (como a triiodotironina, T_3), mas também o GH e vários fatores de crescimento parácrinos (SHARPE, 1994; SHARPE et al., 2003). Já que existe uma relação linear entre o número de células de Sertoli e produção espermática diária (JOHNSON, 1986), o nível secreção destas substâncias durante as fases proliferativas das células de Sertoli regulará indiretamente a quantidade de células germinativas na vida adulta. O FSH eleva a taxa de proliferação das células de Sertoli ao passo que a supressão do hormônio reduz em até 40% seu número final (SHARPE et al., 2003). O hipotireoidismo neonatal aumenta em até 150%, enquanto o hipertireoidismo reduz em até 50% a quantidade de células de Sertoli através do adiantamento ou do atraso na idade em que cessa a proliferação celular (SHARPE et al., 2003).

Estudos *in vitro* de células de Sertoli de ratos demonstraram que aumentos nas concentrações de FSH induzem progressivamente o aumento na expressão de receptores de andrógenos (AR) nas células de Sertoli imaturas (ARAMBEPOLA; BUNICK; COOKE, 1998a), efeito potencializado pela T_3 , promovendo a maturação funcional das células de Sertoli e suprimindo a expressão do Hormônio Anti-Mulleriano (ARAMBEPOLA; BUNICK; COOKE, 1998b). Além disto, o crescente aumento na proliferação de células de Sertoli, sob estímulo do FSH, resulta no estabelecimento de contato físico entre células adjacentes, o que pode provocar inibição nesta proliferação celular. Por ocasião da puberdade, aumentos nas concentrações de FSH e T , coincidindo com a expressão do AR nas células de Sertoli, podem promover sua maturação final.

No adulto, há questionamentos sobre a essencialidade do FSH na manutenção da espermatogênese, controvérsia decorrente de duas observações: (1) o bloqueio da ação folículo estimulante resulta em falha na espermatogênese (RAJ; DYM, 1976); (2) a reposição de testosterona em ratos com deficiência gonadotrófica induzida reverte completamente a interrupção da produção espermática (AWONIYI et al., 1989a), mesmo quando as concentrações de testosterona no fluido dos túbulos seminíferos apresentam valores em torno de 40% de sua concentração normal.

Apesar de ser possível ocorrer espermatogênese sem a presença de FSH (AWONIYI et al., 1989b; McLACHLAN et al., 1996; ZIRKIN et al., 1986), diversos estudos *in vivo* utilizando ratos como modelo animal demonstram a necessidade de LH e FSH no processo de divisão ao qual as espermatogônias e os espermatócitos estão submetidos durante a espermatogênese.

Indicações de que o FSH e a testosterona desempenham funções independentes durante a espermatogênese resultaram na conclusão de que o FSH atue no estímulo à divisão, maturação, capacidade secretória e arranjo do citoesqueleto das células de Sertoli; estímulo à meiose de espermatogônias e talvez uma ação anti-apoptose em espermatogônias e espermatócitos (McLACHLAN et al., 1996). A testosterona, por sua vez, estimularia a ocorrência normal da espermiogênese.

3.5.2 MECANISMOS PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS TESTICULARES

Além dos mecanismos endócrinos de controle da reprodução, parece haver a influência de mecanismos parácrinos e autócrinos, os quais estariam envolvidos na coordenação das funções locais dos dois compartimentos testiculares, túbulos seminíferos e interstício, através da modulação do sistema endócrino.

Uma intrincada rede de intercomunicações entre as células constituintes dos testículos inclui hormônios esteróides e fatores de natureza protéica e peptídica. A comunicação entre as células de Sertoli e as células germinativas é realizada através da inhibina, activina e fatores transformadores do crescimento: *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), *Insulin-like Growth Factor I* (IGF1), interleucinas, transferrina e *Androgen Binding Protein* (ABP). Tais substâncias atuam seletivamente em determinados tipos celulares estimulando a síntese de DNA, transportando e permitindo o armazenamento de andrógenos, regulando a divisão, proliferação e maturação celular ou estimulando a secreção (ROSER, 2001). Os mesmos mecanismos e várias substâncias em comum atuam nas intercomunicações entre células de Leydig e Sertoli, entre células de Leydig e células mióides peritubulares e entre células de Sertoli e células mióides peritubulares. Até o momento não há registros da identificação de mecanismos parácrinos e/ou autócrinos atuando entre células germinativas e células mióides peritubulares.

3.5.3 PRECURSORES E FONTE DOS ANDRÓGENOS TESTICULARES

A fonte imediata do anel esteróide necessário à produção de andrógenos consiste em depósitos citoplasmáticos de colesterol (HALL, 1994). Acredita-se que tal colesterol seja originário tanto de lipoproteínas plasmáticas, quanto da produção local, pelas células de Leydig.

O tipo de lipoproteína de onde vem o colesterol testicular parece variar segundo a espécie animal, tendo sido comprovada a existência de receptores específicos no tecido testicular para lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL) (HALL, 1994; HENRICKS, 1991).

Sabe-se que o colesterol é uma molécula sintetizada *de novo* em muitas células somáticas, através de uma série de reações enzimáticas e envolvendo diversas moléculas. Inicialmente ocorre a ligação C–C entre 18 unidades de acetil coenzima A (acetil COA). Num ponto mais avançado há a formação do esqualeno, com 30 carbonos e, no último estágio, ocorre a formação do colesterol após a remoção de dois grupos metil, redução de uma dupla ligação de uma cadeia lateral e a transferência de uma dupla ligação do C-4 para o C-14 de uma molécula de lanosterol (HENRICKS, 1991).

A comprovação de que há produção de colesterol nos testículos veio de estudos onde tecido testicular incubado com acetato (precursor da acetil COA) marcado com ^{14}C resultou na produção de testosterona incorporando tal marcador (HALL, 1994).

É consenso que o principal local de produção de andrógenos testiculares é a célula de Leydig (HALL, 1994; HENRICKS, 1991; RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991). Contudo, Hall (1994) cita autores que propõem a capacidade dos túbulos seminíferos em realizar a conversão de colesterol em pregnenolona e, assim, realizar a síntese de andrógenos. Entretanto, o próprio autor reconhece não haver, ainda, evidências científicas de tal evento. Hall (1994) conclui que se pode afirmar somente que os túbulos seminíferos não são capazes de contribuir com quantidades de andrógenos detectáveis pelas técnicas atualmente disponíveis.

3.5.4 SÍNTESE DE ANDRÓGENOS PELAS CÉLULAS DE LEYDIG

A síntese de andrógenos nas células de Leydig inicia com a mobilização do colesterol a partir de depósitos de ésteres de colesterol contidos em gotículas lipídicas dentro do citoplasma. Este colesterol passa para a membrana mitocondrial interna onde uma enzima da família citocromo P450 promove a conversão para pregnenolona através da clivagem da cadeia lateral no C₂₇ em três etapas. Nas duas primeiras, a enzima apresenta a atividade clássica de hidroxilase (HALL, 1994), resultando em dois produtos intermediários: o 22- hidroxí -colesterol e o 20,22-di-hidroxí-colesterol, respectivamente. Na terceira etapa, a atividade liase do citocromo P450 resulta na produção da pregnenolona e de um substrato não utilizável, o isocapraldeído. A pregnenolona move-se para os microssomos onde sofre a ação de enzimas ligadas à membrana (HALL, 1994), incluindo o citocromo P450 de clivagem

de cadeia lateral (P450_{SCC}). O resultado é a transformação de um esteróide de 21 carbonos em um andrógeno de 19 carbonos. Dependendo da via enzimática, utilizada ocorre a conversão para progesterona ou dehidroepiandrosterona (HALL, 1994), os quais serão transformados em androstenediona.

Na chamada via progesterona ou via Δ^4 , a pregnenolona, sob ação do complexo enzimático 3 β -hidroxi-esteróide-desidrogenase/isomerase, é convertida em progesterona; o próximo passo é a ação do citocromo P450_{SCC}, que exerce sua ação hidroxilase, convertendo a progesterona em 17 α -hidroxi-progesterona (17 α -OH-P₄); a última etapa desta via é a conversão da 17 α -OH-P₄ em androstenediona, onde o P450_{SCC} age na forma de liase (HENRICKS, 1991).

Na via dehidroepiandrosterona ou via Δ^5 , o citocromo P450_{SCC} exerce também as atividades de hidroxilase e liase, convertendo seqüencialmente a progesterona, em 17 α -hidroxi-pregnenolona (17 α -OH-P₅) e dehidroepiandrosterona, respectivamente (HENRICKS, 1991). Este último é então convertido em androstenediona pelo complexo 3 β -hidroxi-esteróide-desidrogenase/isomerase.

A formação da androstenediona é o ponto de convergência das duas vias da síntese de andrógenos nos testículos. Sua conversão, ainda nos microsomos (HALL, 1994), para testosterona ocorre sob ação da enzima 17 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (17 β -OHSD).

3.5.5 TESTOSTERONA

Os testículos de um adulto possuem dois importantes papéis: a produção de espermatozóides e a secreção de testosterona, a qual também é necessária para a expressão de características sexuais secundárias.

A testosterona é o andrógeno circulante mais importante nos mamíferos. Sua origem é quase que exclusivamente testicular (HALL, 1994), com uma pequena quantidade (aproximadamente 5%) sendo produzida no córtex das glândulas adrenais (AÜMULER; SEITZ, 1990).

Assim como outros hormônios esteróides, a testosterona é um composto lipossolúvel de dezenove carbonos, sintetizado a partir de um núcleo colesterol nas gônadas e no córtex das adrenais. A molécula possui um oxigênio ligado ao C₃, uma hidroxila ligada ao C₁₇ e uma dupla ligação entre C₄ e C₅ do núcleo ciclopentanoperidrofenantreno (GRANNER, 1998). Seu nome químico é 17β-hidroxi-4-androsteno-3-ona.

O transporte da testosterona na circulação sanguínea é realizado principalmente ligada às proteínas transportadoras albumina e *testosterone-estradiol-binding globulin* (TEBG, 94kDa), com meia-vida de aproximadamente 1 hora (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991) e, nos túbulos seminíferos, ligada a ABP, com menos de 10% de sua concentração total ocorrendo na forma livre. Em murinos, as concentrações testiculares de testosterona são, normalmente, 40 vezes maiores do que as concentrações no soro sanguíneo (McLACHLAN et al., 1996) em razão da produção local. Por outro lado, Zirkin et al. (1989) relataram que

reduções de até 80% nas concentrações de testosterona nos túbulos seminíferos permitem a ocorrência quantitativamente normal da espermatogênese e que, abaixo destes níveis (cerca de 13 ng/mL), há uma redução dose-dependente no número de espermátides presentes nos testículos de ratos. Desta forma, animais maduros, são diretamente e expressivamente dependentes de testosterona, no que diz respeito à produção de células germinativas viáveis, mas parece haver uma quantidade do andrógeno maior do que aquela necessária para a plena ocorrência da espermatogênese. Em humanos, as concentrações plasmáticas médias de testosterona e dihidrotestosterona foram quantificadas por Laudat, Guechot e Palluel (1998) como sendo 0,20 e 0,35 ng/mL, respectivamente. Na espécie bovina, várias publicações relataram concentrações de testosterona com alguma variação nos resultados. Barth e Bowman (1993) observaram que as concentrações basais periféricas de testosterona apresentaram valor médio de 0,63 ng/mL enquanto as concentrações em momentos de pico de secreção apresentaram valor médio de 5,27 ng/mL, resultando numa concentração geral média de 2,69 ng/mL. O fluido testicular, segundo Wite (1982), contém 0,23 ng/mL de testosterona. Por outro lado, Sauerwein et al. (2000) detectaram concentrações séricas de testosterona variando entre 2,8 e 6,4 ng/mL enquanto as concentrações seminais variaram entre 1,9 e 3,8 ng/mL.

Barbosa (1987) verificou que a variação nos níveis plasmáticos de testosterona oscilou entre 2,1 e 0,3 ng/mL para a raça Canchim e entre 1,5 e 6,6 ng/mL para a raça Nelore ao longo do dia. Na raça canchim as maiores concentrações foram observadas entre 8 e 20 horas do dia, com picos de secreção (2,40 ng/mL) a cada 6 horas.

A produção de testosterona e, por extensão, de células espermáticas viáveis, está sujeita ao controle endócrino que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e suas secreções. Assim, as concentrações plasmáticas dos diferentes hormônios têm grande impacto sobre a espermatogênese, mas ainda hoje muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de esclarecer completamente o controle e funções de cada um dos hormônios ligados à reprodução.

A inibição da secreção de GnRH pelo hipotálamo, um dos métodos de estudos da regulação endócrina da espermatogênese, reduz as concentrações de testosterona a níveis semelhantes aos de animais castrados e resulta em redução severa na espermatogênese, onde somente algumas células progridem além do estágio de espermátócito primário. Entretanto, esta condição pode ser imediatamente revertida através da aplicação de testosterona, mesmo após algumas semanas (McLACHLAN et al., 1994a), indicando que foi mantida intacta uma população estável de espermatogônias, apesar de seu número reduzido.

Segundo Zirkin et al. (1989), retirando-se o estímulo do LH, as concentrações testiculares de testosterona caem para 3% de seu valor normal (concentrações aproximadas às do soro sanguíneo). Neste caso, foi observado experimentalmente que a espermatogênese pode ser restaurada, ao menos em parte, através da aplicação de implantes de testosterona, quando então as concentrações séricas atingem 5 vezes seu valor normal e as concentrações testiculares atingem cerca de 20% de sua normalidade.

A ausência aguda de testosterona produz um padrão distinto de degeneração nas células espermáticas. Estudos *"in vivo"* revelaram que após um período de poucos dias, a eliminação de células de Leydig por citotoxicidade produz o

aparecimento abrupto do número de núcleos picnóticos e vacúolos citoplasmáticos (características de degeneração celular) em muitos estágios do ciclo espermático, afetando particularmente espermátócitos na fase de paquíteno e espermátides (ZIRKIN et al., 1989). Verificou-se que, particularmente nos estágios VII e VIII do ciclo espermatogênico, a degeneração de espermátócitos pode ser evitada com administração de testosterona. Contudo, em situações de ausência crônica do andrógeno não se observa tal padrão de degeneração. O que ocorre é uma redução de aproximadamente 40% na população de espermatogônias e espermátócitos, mas esta redução não se agrava com o decorrer do tempo. Estas observações sugerem a necessidade da testosterona na manutenção das populações espermáticas, mas, no entanto, a espermatogênese em situações crônicas não cessa completamente, ocorrendo em um grau reduzido (McLACHLAN et al., 1994b, 1996). Nesta situação, uma reposição hormonal que permita aumento nas concentrações de testosterona testicular promove a elevação no volume de gônadas e conteúdo espermático para 85% de seu normal, ainda que o número de espermatogônias permaneça reduzido. Porém, é interessante observar que Sprando et al. (1990) afirmam que a ineficácia de se restabelecer a espermatogênese com altas doses de testosterona em cobaias submetidos à supressão deste esteróide pode ser devido a: (1) a necessidade de concentrações ainda maiores de testosterona por parte das espermatogônias; (2) a ausência de LH resulta na perda de secreções das células de Leydig que não a testosterona, as quais seriam essenciais para a plena ocorrência da espermatogênese.

Apesar de McLACHLAN et al. (1996) e outros pesquisadores atribuírem à testosterona importante papel no desenvolvimento de espermatogônias e

espermátocitos, YUN-TIAN SUN et al. (1990) acreditam que sua principal função seria propiciar o alongamento de espermátides.

Além das funções já citadas, um aspecto de grande importância envolvendo a atuação da testosterona é o fato de que as glândulas sexuais acessórias são dependentes da presença constante de andrógenos na circulação para manutenção de sua integridade estrutural e funcional (AUMÜLLER; SEITZ, 1990). O declínio nas concentrações de andrógenos, seja fisiológico ou induzido, resulta em alterações metabólicas como redução na síntese de proteínas e atividade secretória, além da perda de receptores para andrógenos. É natural, portanto, assumir que qualquer fator que provoque a redução nas concentrações de testosterona prejudica não somente a espermatogênese, mas também a produção e secreção normais de outros constituintes do sêmen.

3.5.6 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

De constituição peptídica (191 aminoácidos, aproximadamente 21,8 kDa), o Hormônio do Crescimento (GH) ou Somatotropina (ST) é secretado por células especializadas da adenohipófise sob estímulo do GHRH. Alguns fatores como estresse e estradiol podem promover aumento na liberação deste hormônio (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991), enquanto outros, como a somatostatina, progesterona e o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF1) têm ação inibitória sobre a secreção.

Admite-se que o GH não atue diretamente nos tecidos-alvo, mas exerça suas ações através das Somatomedinas (WASSERMAN; KALLFELZ; LUST, 1996), as quais são também conhecidas como Fatores de Crescimento Insuliniformes (FCI). De fato, há estudos (SANTOS et al., 1999; SCHAMS et al., 1999) demonstrando relações entre o GH, a insulina e alguns fatores de crescimento, resultando no estabelecimento de que, por mecanismos endócrinos, parácrinos e até mesmo autócrinos, o GH estimule a diferenciação e a maturação celular em diversos locais do organismo. Ruckebusch, Phaneuf e Dunlop (1991) afirmam que o mais importante destes fatores insuliniformes é o *Insulin-like Growth Factor* (IGF1), antigamente denominado Somatomedina C ou Somatomedina A. O reconhecimento de que uma das muitas ações do GH seja estimular a produção hepática de IGF1 e sua proteína carreadora, a Proteína Ligadora de IGF tipo 3 (IGFBP-3) (DUNSHEA et al., 1999), confirma a importante relação do hormônio com os elementos protéicos pertencentes ao sistema IGF.

A importância do Hormônio do Crescimento para a função reprodutiva no macho foi inicialmente deduzida da verificação de que a puberdade sofria atraso em homens com deficiência do hormônio e que tal situação poderia ser revertida com aplicações de GH, conforme observou Sauerwein et al. (2000).

3.5.7 FATORES REGULADORES DO CRESCIMENTO

Há algum tempo um volume considerável de pesquisas vem sendo desenvolvido com enfoque na relação dos hormônios e fatores de crescimento com a atividade dos vários tecidos envolvidos com a reprodução (AUMÜLLER; SEITZ, 1990; CLEMMONS, 1998; GELBER et al., 1992; GLANDER et al., 1996; HENRICKS et al., 1998; HINEY et al., 1996; HOEFLICH et al., 1999; JENNISCHE; SKOTTNER; HANSON, 1987; KHALID; HARESIGN, 1996; LE ROY et al., 1999; LIN et al., 1986a; MOORE; MORRIS, 1993; THOMAS et al., 2002).

O recente desenvolvimento de técnicas de purificação e caracterização de fatores de crescimento prostáticos e seu papel no estímulo autócrino do crescimento da próstata despertaram grande interesse pelo estudo dos hormônios protéicos. A observação de receptores para diferentes proteínas, entre as quais estão a insulina e os *Insulin-like Growth Factors* I e II (AUMÜLLER; SEITZ, 1990), chamou a atenção para sua participação no crescimento prostático, fato que foi confirmado em estudos *“in vitro”*.

3.5.7.1 INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS

Durante as três últimas décadas, a compreensão da regulação da função ovariana e testicular tem aumentado drasticamente. Igualmente tem sido aprofundado o conhecimento sobre os reguladores autócrinos, parácrinos e endócrinos da reprodução. A família dos *Insulin-like Growth Factors* (IGF) é um deles.

Os IGF são potentes agentes mitogênicos conhecidos pelo menos há três décadas, mas com a identificação de seus padrões de secreção tendo ocorrido num período bem mais recente. Tais fatores estão associados a uma série de distúrbios, muitos dos quais envolvem a resposta a alguma injúria (JENNISCHE; SKOTTNER; HANSON, 1987), onde o trauma local promove um grande aumento em sua síntese. O aumento na produção de IGF em resposta ao estímulo está correlacionado com uma resposta celular proliferativa (JENNISCHE; HANSON, 1987).

Duas proteínas integrantes do sistema IGF, os *Insulin-like Growth Factor* I e II, vêm sendo alvo de estudos com relação à sua participação no controle da diferenciação, desenvolvimento e maturação de células germinativas no macho (FLORES et al., 1998). Entretanto maior enfoque é dado ao IGF1 e inúmeras pesquisas vêm, ao longo de alguns anos, sendo conduzidas no sentido de se verificar o cumprimento dos três critérios para a aceitação de que o IGF1 possui funções parácrinas e autócrinas nas células e tecidos dos testículos: (a) presença de receptores e ação biológica nas células locais; (b) secreção local regulada por sinais

fisiológicos; e (c) modificação na atividade das células através do bloqueio do fator ou de seus receptores.

3.5.7.2 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I

O *Insulin-like Growth Factor I* (IGF1) é um peptídeo de 7,5 kDa presente nos tecidos de mamíferos, o qual é lançado na circulação sanguínea principalmente pelo fígado formando um complexo de alto peso molecular com uma proteína carreadora pertencente ao sistema IGF conhecida como *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3* (IGFBP-3). Este peptídeo aparece em concentrações variando entre 250 e 375 ng/mL no fluido folicular ovino (KHALID; HARESIGN, 1996); e entre 271 e 350 ng/mL no soro de touros jovens (THOMAS et al., 2002).

No metabolismo corporal, o IGF1 possui ações autócrinas, parácrinas e endócrinas, apresentando, além da estrutura, funções semelhantes às da insulina tais como promover aumento na captação da glicose e ativação da síntese protéica (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991).

Sua produção é regulada pela nutrição, concentrações de insulina e hormônios esteróides, mas o GH é o mais potente estimulante da secreção deste fator de crescimento, tendo muitos de seus efeitos metabólicos e somatogênicos mediados pelo IGF1 (WISE et al., 1996).

Vários estudos identificaram a ação do IGF1 como um sinal metabólico para o eixo hipotálamo-hipófise. Adam et al. (1997) referiram-se a estudos “*in vitro*” nos

quais comprovou-se que o IGF1 estimulou a liberação de GnRH pelo hipotálamo e LH pela hipófise e que há receptores para IGF1 no hipotálamo e hipófise. Os autores confirmaram esta ação endócrina do IGF1 *in vivo*, onde o fator de crescimento promoveu aumento nas concentrações de LH de fêmeas ovinas quando administrado nas doses de 25 e 50 µg de IGF1 por quilograma de peso corporal.

Hiney et al. (1996) afirmam que o IGF1 de origem periférica contribui para o início da puberdade em fêmeas através do estímulo à secreção de GnRH pelo hipotálamo concomitante com um aumento na síntese de receptores para IGF1 na eminência média durante o primeiro proestro.

Além do hipotálamo e hipófise, receptores para IGF1 foram também identificados nos testículos (FLORES et al., 1998), com alguma imunorreatividade sendo detectada nas células de Leydig e Sertoli em humanos. Estes receptores foram também observados em espermatócitos secundários e espermátides jovens na espécie humana segundo Vanelli et al. (1988), além de outras estruturas presentes no sistema reprodutivo masculino.

Há relatos da observação da expressão do mRNA para IGF1 em células de Leydig em várias espécies (LE ROY et al., 1999), apesar de ainda existirem contradições nos diferentes resultados observados em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, receptores para IGF do tipo I foram observados nas células de Leydig através de diferentes técnicas (LE ROY et al., 1999), sendo a ação deste fator de crescimento regulada por LH e Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) em células suínas e murinas. Nestas espécies há evidências de que o IGF1 estimula a proliferação e diferenciação das células de Leydig, a produção de testosterona (GELBER et al., 1992; LIN et al., 1986a), síntese de Adenosina Monofosfato cíclico

(cAMP) mediada por LH/hCG (BERNIER et al., 1986; LIN et al., 1986a) e DNA (KHAN; TEERDS; DORRINGTON, 1992; MOORE; MORRIS, 1993), aumento no número de receptores para LH/hCG (PERRARD-SAPORI et al., 1987), aumento na quantidade e atividade de mRNA de várias enzimas esteroidogênicas (CHUZEL et al., 1996) e da proteína “Steroidogenic Acute Regulatory Protein” (StAR) (LE ROY et al., 1999).

O IGF1 é considerado um importante fator para o desenvolvimento de células germinativas e para a maturação do espermatozóide. Em humanos, o plasma seminal contém IGF1 e IGF-II, e foi comprovado (GLANDER et al., 1996) que as concentrações de IGF1 neste fluido apresentaram uma correlação positiva ($r = 0,75$) com a concentração espermática e com a proporção de espermatozoides humanos morfológicamente intactos.

Evidências de que o sistema IGF pode estar envolvido no processo de fertilização em bovinos foram também obtidas por Henricks et al. (1998), os quais notaram a presença de receptores para IGF1 no espermatozóide, a presença deste fator no sêmen, e a habilidade do IGF1 em estimular a motilidade e progressividade espermática.

Entretanto, foi observado que touros selecionados para uso em inseminação artificial, apresentando valores maiores de vigor e motilidade do sêmen em comparação com um segundo grupo apresentando sêmen de qualidade inferior, mostraram uma menor concentração de IGF1 no plasma seminal (HOEFLICH et al., 1999), apesar dos níveis de IGF-II terem sido maiores. Segundo os autores, este contraste nos efeitos do conteúdo de IGF1 nas duas espécies parece ser devido à

ação da proteína transportadora conhecida como *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3* (IGFBP-3).

3.5.7.3 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEINS

Como um dos constituintes do sistema IGF, as *IGF Binding Proteins* (IGFBP) são proteínas transportadoras que modulam a ação dos IGF e são a principal variável que determina a quantidade de IGF1 disponível para ligar-se ao respectivo receptor na célula-alvo (CLEMMONS, 1998).

Estudos realizados por Davies, Wass e Ross (1991) e por Fowlkes e Freemark (1992) propõem que a biodisponibilidade de IGF no organismo está ligada à sua liberação da IGFBP em decorrência da ação de proteases sobre este carreador.

Além de seu papel como modulador da ação dos IGF, especula-se a possibilidade desta *binding protein* possuir alguma função independente (KOK-ONN LEE et al., 1994). Entretanto, sua função reguladora da ação do IGF1 é considerada a mais importante, tendo sido verificado que a IGFBP tipo 3 pode interagir com a superfície celular, impedindo a ligação do IGF com seu receptor (MOHSENI-ZADEH; BINOUX, 1997a). Assim, além da ação reguladora dependente de sua interação com o IGF1, estes pesquisadores forneceram evidências de que o mecanismo de controle pode ser realizado também de maneira independente da afinidade da IGFBP-3 pelo IGF1.

A maior parte da IGFBP-3 pode ocorrer, no fluido seminal, na forma de pequenos fragmentos (aproximadamente 16 kDa), conforme observado em estudo realizado por Plymate et al. (1996). A *binding protein* foi detectada na forma intacta somente no fluido prostático humano, onde ocorre em concentrações aproximadamente três vezes maiores do que no fluido seminal. Este mesmo estudo fornece indícios que corroboram resultados de outros trabalhos ao verificar que existe uma correlação inversa entre a presença de PSA e IGFBP-3.

Os fragmentos de IGFBP-3 são resultantes da ação de uma protease presente em altas concentrações no plasma seminal (KOK-ONN LEE et al., 1994) conhecida por *Prostatic Specific Antigen* (PSA) e que provavelmente se constitui, juntamente com a protease plasmina, num mecanismo de controle da biodisponibilidade de IGFs tanto na circulação sistêmica como no ambiente celular (COHEN et al., 1992; MOHSENI-ZADEH; BINOUX, 1997a). Sabe-se que fragmentos gerados pela ação da plasmina, apesar de possuírem pouca ou nenhuma afinidade pelo IGF1, ainda poderão atuar como potentes inibidores mitogênicos deste IGF (MOHSENI-ZADEH; BINOUX, 1997b).

3.5.8 INTERRELAÇÕES ENTRE GH, SISTEMA IGF E TESTOSTERONA

O efeito da ST sobre a função testicular nas diferentes espécies parece ser variável. Há relatos de que a administração do hormônio induz a aumento na

secreção de testosterona em hamsters (OH et al., 1995) e ratos (OHYAMA et al., 1995). Receptores para o ST e IGF1 estão presentes nos testículos (PERRARD-SAPORI et al., 1987) e os dois hormônios podem estimular a esteroidogênese testicular *in vitro* (BERNIER et al., 1986; LIN et al., 1986a; PERRARD-SAPORI et al., 1987). Sauerwein et al. (2000), entretanto, não verificaram aumento nas concentrações sanguíneas de testosterona em resposta ao tratamento com rGH bovino, mas acreditam que a melhor eficiência reprodutiva obtida por touros tratados em relação a animais controle deveu-se a efeitos positivos sobre a espermatogênese e sobre o ambiente do espermatozóide.

Estudos em humanos mostram que, para indivíduos sadios ou subférteis, o tratamento com GH exógeno também não afeta os padrões de gonadotrofinas e de testosterona sanguíneos, mas aumenta os níveis séricos de IGF1 e de proteína ligadora de IGF (IGFBP-3) (OVESEN et al., 1993). A relação entre o GH e o sistema IGF foi evidenciada também em suínos. Quando o GH exógeno é administrado, uma cascata de eventos endócrinos inicia-se, incluindo aumentos nas concentrações de IGF dos tipos I e II circulantes (BUONOMO; KLINDT, 1993). Em bovinos, o mesmo evento se repete, determinando um aumento na concentração sérica de IGF1 (SANTOS et al., 1999). Assim, acredita-se que muitas das respostas ao GH exógeno são mediadas pelo aumento nas concentrações de IGF.

3.6 TERMORREGULAÇÃO

A existência orgânica depende das reações pelas quais a energia química é transformada em calor. A velocidade dessas reações é afetada pela temperatura, de modo que a produção de calor no organismo aumentará duas a três vezes caso a temperatura local aumente em 10 °C (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996).

Muitas condições são capazes de causar variações normais na temperatura corporal dos animais homeotérmicos como idade, estação do ano, hora do dia, temperatura ambiental e ingestão de água, entre outras. Nas espécies de hábito diurno, como os bovinos, as temperaturas corporais máximas são encontradas normalmente no início da tarde e as temperaturas mínimas nas primeiras horas da manhã (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996). Sabe-se ainda que existem gradientes de temperatura no sangue, tecidos e reto, com as temperaturas mais baixas sendo observadas nas partes mais externas do corpo, a exemplo dos testículos.

Um estado estacionário térmico ocorre quando o efeito do ganho calórico é equilibrado pelo efeito da perda calórica. Para Andersson e Jónasson (1996), a obtenção deste estado de equilíbrio térmico é de vital importância nos animais homeotérmicos, onde os vários mecanismos termorregulatórios consistem em uma série de ajustes fisiológicos que buscam estabelecer o estado térmico estacionário no nível da temperatura normal da espécie e do tecido. Entretanto, a amplitude para a qual tais ajustes são requeridos é altamente dependente da temperatura externa e nem sempre é suficiente para a manutenção da temperatura corporal adequada.

Alterações fisiológicas como vasodilatação periférica e aumentos na frequência respiratória e sudorese são, entretanto, mecanismos fisiológicos de extrema importância.

A vasodilatação cutânea produz aumento na temperatura da pele, o que facilita o gradiente de trocas térmicas pelas temperaturas ambientais abaixo da temperatura cutânea. Esta vasodilatação pode ser resultado tanto de uma ação do sistema nervoso central como de uma ação direta do calor sobre os vasos sanguíneos locais. Contudo, em temperaturas ambientais mais elevadas (acima de 30 °C), a vasodilatação cutânea não é suficiente para efetivamente dissipar calor (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996) e deverão ser ativados outros mecanismos de termorregulação.

Segundo Andersson e Jónasson (1996), a perda calórica evaporativa é uma importante forma de resfriamento corpóreo. Enquanto é necessária apenas uma caloria para elevar em 1 °C a temperatura de um grama de água, são necessárias 600 calorias para evaporar a mesma quantidade de água do corpo. A sudorese e polipnéia são os mecanismos mais eficientes de promoção de perda calórica evaporativa. Em bovinos, a sudorese ocorre constantemente e relativamente ao aumento da temperatura ambiental e a polipnéia inicia normalmente quando a temperatura retal atinge mais de 40 °C.

3.6.1 TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR

Os testículos, assim como qualquer outra parte do organismo, conta com a ação de mecanismos gerais e específicos para controlar a temperatura de seus

tecidos. O que permite a ocorrência da termorregulação testicular são as características anatômicas dos testículos e do escroto. A pele escrotal é desprovida de gordura subcutânea, mas rica em glândulas sudoríparas (ASHDOWN; HAFEZ, 1995). A *tunica dartos*, o componente muscular do escroto, torna possível variar a área de superfície e a espessura da parede escrotal através de sua contração. Stabenfeldt e Edqvist (1996) afirmam que, por outro lado, dois mecanismos especializados são fundamentais na regulação da temperatura testicular: (1) antes de sua chegada ao testículo, o sangue arterial é resfriado por um sistema de “contra-corrente”, onde troca calor com o sangue venoso no plexo pampiniforme localizado externamente e cranialmente aos testículos. As extensas circunvoluções e anastomoses dos vasos arteriais e venosos presentes permitem que o calor seja transferido do lado arterial para o lado venoso mais frio que drena o testículo; (2) a atividade dos músculos cremaster externo e *tunica dartos* permite que os testículos sejam elevados para junto do corpo à medida que a temperatura ambiente diminui (contração muscular) e se desloquem para mais longe à medida que a temperatura ambiente aumenta (relaxamento muscular).

Sabe-se que a temperatura nos testículos deve se manter 4 a 5 °C abaixo da temperatura corporal para que a espermatogênese ocorra normalmente (KASTELIC; COULTER; COOK, 1995). Para isto, é imprescindível a presença de um eficiente mecanismo de termorregulação para o perfeito funcionamento do sistema reprodutivo. Em condições amenas, os mecanismos de termorregulação são capazes de manter a temperatura interna dos testículos em torno de 4 a 7 °C abaixo da temperatura retal quando a temperatura ambiente está entre 5 e 21 °C

(STABENFELDT; EDQVIST, 1996). Caso a temperatura ambiental se eleve acima de 35 °C, esta diferença de temperatura pode ser reduzida para aproximadamente 2 °C, refletindo uma dificuldade do organismo em manter a temperatura testicular dentro da faixa adequada para o órgão. Esta capacidade de promover, ao menos parcialmente, a regulação térmica das gônadas do macho foi há muito constatada por Johnston, Naelapaa e Frye Junior (1963) ao observarem que touros mantidos em condições experimentais foram capazes de manter a temperatura da superfície escrotal abaixo das temperaturas corporal e ambiental em condições de estresse térmico pelo calor.

Porém, situações onde há febre, deposição de gordura na base escrotal e traumas, podem interferir com a termorregulação dos testículos (BARTH; BOWMAN, 1994), resultando em distúrbios na espermatogênese. Além disso, a capacidade em regular a temperatura dos testículos difere entre touros e, conforme já verificado (BRITO et al. 2002, 2004), raças européias possuem dificuldade em manter a homeotermia testicular quando em ambientes tropicais.

O mecanismo de termorregulação dos testículos é, portanto, um elemento de grande importância na reprodução dos bovinos, particularmente quando se trata de animais de pouca adaptação mantidos a campo em regiões de clima tropical.

3.7 ESTRESSE TÉRMICO

Quando os mecanismos responsáveis pela dissipação de calor corporal são ineficazes na regulação da temperatura corpórea, diversas alterações fisiológicas ocorrem e instala-se, então, uma condição desfavorável à integridade animal conhecida como estresse térmico.

Os efeitos da alta temperatura ambiental afetam todo o organismo animal reduzindo a sensação de conforto, exigindo maior dispêndio de energia com o processo de termólise e reduzindo diversas atividades, entre estas o metabolismo. Uma das conseqüências é o desvio da secreção normal de substâncias imprescindíveis para o desempenho normal de diversas funções orgânicas como a reprodução (ANDERSSON; JÓNASSON, 1996). Vacas em condições de elevada temperatura ambiental, por exemplo, apresentam alterações em seus padrões de secreção dos hormônios reprodutivos. O estresse calórico prolongado causa mudanças nos padrões de secreção de cortisol, tiroxina, prolactina e hormônio luteinizante (LEE, 1993), resultando em redução na taxa de concepção de 66% para 35% e aumento de 25% na perda embrionária. Em machos, além das alterações sistêmicas que incluem alterações nos sistemas respiratório, circulatório e nos padrões hormonais de secreção, pode haver aumento da temperatura testicular conseqüente às alterações sistêmicas ou aumento da temperatura por ação direta do calor sobre os testículos.

3.8 DEGENERAÇÃO TESTICULAR PELO CALOR

Os testículos são muito sensíveis a uma grande variedade de influências adversas que incluem anormalidades genéticas, hipóxia, toxicidade e estresse. Tais influências atuam de forma negativa na secreção hormonal e produção de espermatozoides. Vários fatores foram apontados por Blanchard e Johnson (1997) como causa de variação na produção normal de espermatozoides: estação do ano, idade, volume testicular e integridade dos tecidos envolvidos na reprodução além de fatores não determinados. Em animais com baixa produção espermática também se observam, freqüentemente, variações nas concentrações dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise.

Barth e Bowman (1994) acreditam que diferentes tipos de injúria afetam a função testicular através de diferentes mecanismos, resultando em diferentes tipos de anormalidades espermáticas. No caso da degeneração testicular em consequência de estresse térmico, os efeitos deletérios podem tanto ser exercidos por ação local como através de alterações nos padrões de secreções hormonais. Gabaldi (2000) afirma que nas espécies em que os testículos encontram-se fora da cavidade abdominal, envolvidos pelo escroto, “a função testicular pode ser afetada não somente pela alteração da temperatura corporal, mas também pelo calor que é aplicado diretamente nos testículos, como por exemplo, a insulação escrotal”, sendo esta última situação mais efetiva no aumento da temperatura testicular.

As alterações fisiológicas que ocorrem com o estresse pelo calor são resultantes de mudanças no fluxo sanguíneo e linfático, tensão de oxigênio e

desvios em vias metabólicas específicas e do sistema enzimático (GABALDI, 2000). Barth (1993) acredita que o aumento na temperatura local leva ao aumento no metabolismo e na demanda de oxigênio; com isto, o testículo entra em hipóxia, pois o fluxo sanguíneo não é suficiente para compensar a nova exigência fisiológica.

Ao exame clínico externo podem ser visualizadas alterações anatômicas no tamanho, peso e textura dos testículos. Durante o exame de palpação dos testículos, a observação de pequeno volume na cauda dos epidídimos, diminuição rápida no perímetro escrotal e redução na consistência testicular sugerem diminuição na espermatogênese e degeneração do tecido testicular. Assimetria dos testículos e fibrose tecidual são outras possíveis observações. Nos casos de degeneração, os ejaculados são freqüentemente pouco concentrados, com aspecto aquoso.

De acordo com Wenkoff (1988), os primeiros efeitos observados ao nível celular ocorrem nos espermátócitos primários, os quais dividem-se por meiose e são mais sensíveis que espermatogônias dos tipos A e B, as quais dividem-se por mitose. O cenário observado varia segundo a intensidade do dano ao epitélio seminífero. Os efeitos nos espermátócitos primários apresentam-se como distúrbios na formação do fuso nas células em divisão. Em casos mais brandos, os espermátócitos secundários podem alcançar o estágio de anáfase antes de tais distúrbios ocorrerem. A célula passa pelo processo de divisão, mas ocorrem alterações nos cromossomos e no núcleo das células-filhas, resultando em aumento na quantidade de patologias de cabeça, além de baixa motilidade e gotas citoplasmáticas proximais. Nos casos moderados, os cromossomos das células em prometáfase são espalhados no interior da célula e lisados pelo citoplasma

resultando nas chamadas “células-fantasma”, as quais são raras e aparecem em pequeno número. Este grau de degeneração normalmente resulta em redução na concentração com baixa motilidade e grau moderado de patologias como gotas citoplasmáticas proximais, “pouch formation” e outros tipos de vacúolos celulares, além de uma série de defeitos nucleares. Em casos de degeneração mais severa e/ou prolongada, os distúrbios celulares ocorrem durante a metáfase e os cromossomos permanecem próximos ao pólo equatorial condensando-se e formando um núcleo picnótico. A ocorrência de várias destas estruturas conjuntamente forma um sincício conhecido como “célula gigante”. Quando a severidade do dano ao tecido testicular resultar em falha na reposição de espermatogônias deverá ocorrer azoospermia.

A avaliação histológica de tecido testicular de touros realizada por Casady, Myers e Legates (1953) mostrou que a exposição destes animais a duas semanas de alta temperatura pode ser suficiente para causar degeneração do epitélio germinativo e ausência de espermatogênese. Animais mais profundamente afetados não apresentavam células mitóticas ou sincício das células de Sertoli nos túbulos seminíferos.

A ausência completa de células da linhagem germinativa também pode ser observada em túbulos seminíferos de várias espécies como consequência de exposição ao calor, onde visualizam-se somente células de Sertoli (SHARPE et al., 2003).

O estudo da relação entre temperatura ambiente e características seminais de touros de central de inseminação artificial (SILVA E CASAGRANDE, 1976) mostrou efeito negativo de temperatura média de 34 °C sobre a concentração espermática

após 24 dias. Também a motilidade foi afetada, havendo correlação negativa com a temperatura entre 0 e 30 dias, mas tornando-se positiva a partir deste período. Houve redução do pH seminal e aumento crescente no aparecimento de anormalidades espermáticas a partir dos 12° e 18° dias, respectivamente. O resultado de tais interações resultou em redução na congelabilidade do sêmen, havendo uma correlação negativa crescente com a temperatura a partir de uma semana de exposição a 34 °C.

Condições de estresse calórico, obtidas experimentalmente em câmara climática, provocaram redução na concentração, contagem total de células e na motilidade no sêmen de *Bos taurus* puros e cruzados (JOHNSTON; NAELAPAA; FRYE JUNIOR, 1963), sendo este efeito mais pronunciado nos animais puros. Silva e Casagrande (1976) também verificaram correlação negativa entre temperatura ambiente e concentração espermática em *Bos indicus*, enquanto Barth e Bowman (1994) verificaram diminuição na concentração e redução da motilidade no sêmen de *Bos taurus* submetidos a insulação testicular.

Estudos da morfologia espermática em condições desfavoráveis à termorregulação mostraram que houve aumento pronunciado nos defeitos espermáticos totais de animais submetidos a altas temperaturas em câmara climática (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953) e insulação escrotal (BARTH; BOWMAN, 1994). Johnston, Naelapaa e Frye Junior observaram que taurinos puros apresentam maior intensidade no aumento destas anormalidades espermáticas em comparação com animais cruzados e, quatro semanas após a instalação da degeneração, há redução na ocorrência destas anormalidades que, entretanto,

permaneceram em uma porcentagem acima daquela observada antes da imposição do estresse pelo calor.

Dentre os defeitos que apresentam aumento em seu percentual em resposta à temperatura elevada estão cauda enrolada, ausência de cauda e cabeça anormal (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953); cabeça piriforme (SKINNER; LOUW, 1966); alterações de acrossoma (MEYERHOEFFER et al., 1985); cabeças destacadas e piriformes, gotas protoplasmáticas distal e proximal, alterações de peça intermediária, knobbed acrossoma e vacúolos nucleares (BARTH; BOWMAN, 1994).

Assim, a ineficácia dos mecanismos de termorregulação testicular pode refletir em diminuições na eficiência reprodutiva do rebanho, como indicaram Lunstra e Coulter (1997) ao constatarem haver uma ligação entre temperatura da superfície escrotal em touros e a taxa de concepção em novilhas servidas em monta natural.

3.9 INSULAÇÃO ESCROTAL

O aumento local de temperatura é a técnica ideal para o estudo das alterações morfológicas e fisiológicas ocorridas nos testículos e dos distúrbios nos mecanismos parácrinos e autócrinos, à medida que são excluídas as interferências sistêmicas. A técnica para se obter tal efeito consiste em bloquear ou reduzir a capacidade termorregulatória dos testículos através do acoplamento de uma bolsa térmica ao escroto. Tal bolsa, revestida de material isolante, mantém a temperatura local constantemente acima daquela considerada adequada.

A palavra insulação deriva do inglês *insulation*, termo freqüentemente usado nos Estados Unidos em referência às vestimentas de inverno, significando isolamento térmico. A insulação escrotal vem sendo utilizada há muitos anos por alguns pesquisadores para estudo dos efeitos do aumento de temperatura local sobre as características seminais e fertilidade dos bovinos.

Austin, Hupp e Murphree (1961) promoveram a insulação térmica em touros da raça Hereford por 72 horas, onde observaram médias de temperatura retal de 38,4 °C e temperatura da superfície escrotal de 36,1 °C. Este procedimento promoveu decréscimo significativo na concentração espermática por quatro a sete semanas. Houve decréscimo contínuo na motilidade espermática (em torno de 12%) por duas a cinco semanas após a insulação, com retorno à normalidade após seis semanas.

Vogler et al. (1991) e Vogler et al. (1993) insularam touros da raça holandesa por 48 horas onde a temperatura da superfície escrotal variou entre 33,3 e 36,4 °C.

A partir da segunda semana do tratamento houve decréscimo de 10-30% na motilidade com aumento na ocorrência de patologias espermáticas em até 70% após 18 dias (VOGLER et al., 1993). Foi observado um padrão distinto para as diferentes anormalidades morfológicas. A partir do nono dia teve início uma elevação crescente nas patologias de cabeça e acrossoma, as quais foram as mais expressivas. Após 15 dias houve aumento no aparecimento nas patologias de peça intermediária e peça principal da cauda. Após 21 dias aumentaram as ocorrências de gotas protoplasmáticas. O retorno do percentual de células morfolologicamente anormais à valores semelhantes ao período pré-insulação ocorreu num prazo de aproximadamente 40 dias.

A insulação escrotal também foi utilizada por Gabaldi (2000) para estudar os efeitos da temperatura sobre as características seminais e hormonais de touros. Em seu estudo, a autora manteve a bolsa insuladora por 96 horas acoplada aos testículos dos animais, obtendo temperatura da superfície escrotal média de 36,4 °C. As principais observações foram diminuição na consistência testicular, reduções na motilidade, vigor e concentrações espermáticas, e aumentos na ocorrência de alterações citológicas no sêmen e morfológicas nos espermatozóides.

3.10 EFEITOS DA SOMATOTROPINA EXÓGENA

Tratamentos prolongados com a somatotropina suína (pST), assim como ocorre em outras espécies, promove aumentos consideráveis nas concentrações

plasmáticas de GH acima dos níveis basais por um período de aproximadamente 12 horas (RICKES et al., 1991). Foi ainda relatada naquela espécie (WISE et al., 1996), redução nas concentrações de testosterona e aumento nas concentrações de IGFs dos tipos I e II em resposta a pST.

Os efeitos da administração prolongada da somatotropina sobre a reprodução foram relatados na espécie bovina por Deaver e Bryan (1999), os quais acreditam que estes efeitos podem ser positivos ou negativos quando da administração em doses suficientes para incrementar a produção de leite, sendo, contudo, de caráter temporário.

Na espécie humana, a suplementação de GH produz efeitos significativos sobre pacientes com baixa resposta ao tratamento com hCG. Mulheres em menopausa sob tratamento para fertilização “*in vitro*” (HUANG et al., 1993) apresentaram aumento nas concentrações séricas de IGF1 e IGFBP-3, havendo alguma correlação ($r = 0,43$) entre os dois fatores. No fluido folicular, tanto estes componentes do sistema IGF, quanto o GH e estradiol foram observados em concentrações mais elevadas em comparação com mulheres não submetidas ao tratamento com GH. Em homens, a administração do hormônio em indivíduos saudáveis promoveu aumento nas concentrações sanguíneas de IGF1 sem alterar, contudo, os níveis séricos de testosterona e de gonadotrofinas (OVESEN et al., 1993).

Min et al. (1999) observaram que a somatotropina exógena aumentou em de 30-40% nas concentrações plasmáticas de IGF1 em cordeiros com menos de um ano de idade.

O estímulo ao desenvolvimento e diferenciação celular é atribuído também ao GH. Leitões tratados com GH apresentaram maior diâmetro de testículos, e massa relativa de espermátócitos e espermátides 2,5 vezes maior do que animais controle, sem haver alteração em tecidos intersticiais. Com base nestes resultados, Swanlund et al. (1995) concluíram que o GH exógeno promoveu a maturação tubular e das células de Sertoli, caracterizada pela hipertrofia das células, aumento na formação de lúmen e favorecimento ao início de espermatogênese. A ocorrência de testículos de tamanho reduzido e conseqüente desenvolvimento anormal de células espermáticas em roedores foi associada à deficiência de somatotropina por Gravance et al. (1997) reforçando as constatações feitas por Swanlund e sua equipe.

Num estudo pioneiro realizado por Sauerwein et al. (2000), onde os efeitos do GH exógeno foram observados em relação às características espermáticas, constituição seminal e alguns hormônios do plasma sanguíneo, concluiu-se que o uso do rGH pode melhorar as taxas de fertilização em bovinos, atuando diretamente ou indiretamente nas células espermáticas, ou ainda agindo sobre seu metabolismo.

Efeitos do uso do GH foram observados na espécie bovina por Sauerwein et al. (2000), em resposta ao tratamento com GH recombinante em touros sadios, onde se observou aumento na concentração espermática em comparação aos animais não tratados, sem que houvesse aumento na contagem total de células.

Além da esteroidogênese e espermatogênese, o GH parece ser de grande importância em características específicas dos espermatozóides essenciais à fertilidade. O efeito positivo do GH sobre a motilidade espermática foi observado na espécie bovina por Sauerwein et al. (2000), durante e após período de tratamento

com o hormônio recombinante, e por Breier et al. (1996) na espécie murina onde machos com deficiência de ST apresentavam baixa motilidade das células provenientes da cauda do epidídimo.

Portanto, a possibilidade de melhorias nas características espermáticas e alterações na composição do plasma seminal pode advir, ainda que existam resultados inconclusivos, da manipulação das concentrações de hormônios e fatores de crescimento presentes no órgão responsável pela produção e maturação das células da linhagem espermatogênica.

A fase experimental com animais foi conduzida no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal (CBRA-VRA), pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ, USP), *Campus* de Pirassununga, sudeste do estado de São Paulo (21° 56' 13" Sul / 47° 28' 24" Oeste), entre os dias 05 de dezembro de 2003 e 16 abril de 2004. O clima da região é do tipo tropical de altitude com temperaturas médias entre 17 e 27 °C e chuvas concentradas em verões quentes o que o inclui na classificação Cwa, (ADAS, 1983).

O manejo dos animais e as colheitas de sêmen foram realizados nas instalações de manejo de bovinos do CBRA-VRA.

As avaliações seminais foram realizadas, nos Laboratórios de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) CBRA-VRA.

Os ensaios para quantificação de Testosterona e IGF1 foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (USP, *Campus* de São Paulo).

5.1 ANIMAIS E MANEJO ZOOTÉCNICO

Foram utilizados 16 touros da raça Simental, PO, com idades de 34 ± 10 meses. Os animais permaneceram em piquetes contendo capim *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*. A alimentação foi constituída por forragem verde (pastejo), suplementação mineral e, ração concentrada e cana-de-açúcar picada fornecidas em cocho de alvenaria, atendendo as recomendações para a categoria. Cada touro passou por avaliação visual da condição corporal com frequência semanal e pesagem com frequência quinzenal. As informações de condição corporal e peso vivo serviram de parâmetro para determinação da necessidade de suplementação alimentar (ração à base de milho moído e farelo de soja) e também para realizar o cálculo da dosagem do tratamento a ser administrado (bST). O programa sanitário obedeceu às prerrogativas convencionais de prevenção e saúde animal para a espécie.

5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS AOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Previamente ao início do experimento, os animais foram mantidos durante 15 dias em regime de colheita semanal de sêmen para avaliação das características físicas e morfológicas, perfazendo três colheitas. Com base nas avaliações de presença de defeitos espermáticos maiores, defeitos menores e motilidade, foi

calculada a média para cada uma destas características, por animal. Os animais foram então classificados segundo um indicador (nota) que representou a soma dos valores das características espermáticas e distribuídos uniformemente aos quatro grupos ou tratamentos experimentais (tabela 1): (a) grupo controle (CON); (b) grupo insulação (INS); (c) grupo somatotropina (bST); e (d) grupo insulação mais somatotropina (IST).

Tabela 1 – Classificação e distribuição dos animais aos tratamentos experimentais segundo características espermáticas. Pirassununga, 2004

TOURO	DEFEITOS MAIORES	DEFEITOS MENORES	MOTILIDADE ¹	NOTA ATRIBUÍDA ²	TRATAMENTO ³
A137	2	2	25	35	BST
B91	2	3	27,5	39,5	INS/bST
A149	4	3	25	43	INS
A144	3	1	32,5	43,5	CON
A20	7	0	25	46	CON
B18	6	4,5	25	52	BST
A159	4,5	4,5	30	52,5	INS/bST
A99	6	4	27,5	53,5	INS
B25	4	6	32,5	56,5	INS
B1A	7,5	2,5	30	57,5	CON
B5	4,5	5,5	35	59,5	BST
B3	4,5	13	25	64,5	INS/bST
A151	8,5	9,5	32,5	77	INS/bST
A67	16,5	9	27,5	95	INS
B23	16	15	37,5	115,5	CON
A120	17	16	37,5	120,5	BST

¹Para atribuição de notas e conseqüente classificação dos animais, convencionou-se nesta tabela que o valor de motilidade expresso refere-se ao percentual de células sem motilidade.

²A nota atribuída a cada touro foi calculada através da seguinte fórmula: $NOTA = (DEFEITOS\ MAIORES \times 3) + (DEFEITOS\ MENORES \times 2) + (MOTILIDADE \times 1)$; quanto menor a nota, melhores as características seminais.

³Para a distribuição em cada um dos tratamentos experimentais foi realizado sorteio entre cada grupo dos quatro melhores animais (com menores notas), seqüencialmente, até completarem-se todos os tratamentos.

Após a classificação dos animais e a distribuição destes aos diferentes tratamentos, deu-se início a aplicação dos tratamentos experimentais.

5.3 TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em 4 grupos onde: o primeiro grupo (CON, n=4) recebeu aplicações de solução fisiológica (placebo) via subcutânea no mesmo volume aplicado aos animais dos grupos tratados com bST; os animais do segundo grupo foram submetidos a degeneração testicular pelo calor induzida por insulação (INS, n=4) e receberam aplicações de placebo; os touros do grupo três (bST, n=4) receberam aplicações de somatotropina; o quarto grupo de animais passou por insulação testicular e aplicações de somatotropina (IST, n=4).

A degeneração testicular foi obtida através da técnica de insulação testicular descrita por GABALDI (1999) com modificações, onde foi utilizada uma bolsa insuladora confeccionada com material isolante que envolveu completamente os testículos. As bolsas insuladoras foram compostas de três camadas feitas com materiais distintos, cujas características físicas atenderam os seguintes princípios: a) camada externa (a qual ficou em contato com o meio ambiente) resistente e impermeável; b) camada interna (a qual ficou em contato com a pele do escroto) macia e anti-abrasiva; c) camada intermediária (entre as paredes externa e interna da bolsa) isolante térmico razoável, a fim de não dissipar o calor retido no interior da bolsa insuladora. Os materiais escolhidos para a confecção da bolsa foram: bagun

(tecido plastificado) para a parede externa, feltro leve para a parte intermediária e forro sintético não-abrasivo para a parede interna da bolsa.

O período de manutenção da bolsa insuladora foi de 96 horas, quando a termorregulação local foi dificultada, simulando um estresse pelo calor em condições ambientais de alta temperatura. Durante este período foram monitoradas as temperaturas retal e da superfície escrotal dos animais insulados.

A bST foi aplicada com frequência quinzenal (Lactotropin[®], 1,2 mg/kg PV, Eli Lilly do Brasil, Elanco, São Paulo, Brasil) via subcutânea, durante 5 semanas (ANEXO A).

5.4 DELINEAMENTO E MANEJO EXPERIMENTAL

O estudo utilizou um delineamento experimental do tipo blocos ao acaso, onde cada animal foi considerado como unidade experimental, com 4 repetições para cada um dos 4 tratamentos. O arranjo de tratamentos foi do tipo fatorial 2x2 (insulação: 0 e 96 horas; bST: 0 e 1,2 mg/kg). O período experimental (figura 1) foi dividido em fases, onde foram realizadas as amostragens em todos os animais seguindo-se os mesmos procedimentos:

1. SEMANA 01 à SEMANA 03 – previamente ao início da insulação testicular, os touros permaneceram durante 21 dias em regime de colheita de sêmen semanal (células em azul, figura 1). Ao todo foram três colheitas com frequência semanal. Esta fase foi chamada **Período Pré-Insulação**;

2. SEMANA 04 (INSULAÇÃO) – durante o intervalo de 4 dias (célula em vermelho, figura 1), os animais dos grupos INS e IST permaneceram com as bolsas insuladoras, para indução da degeneração testicular. Esta fase foi considerada dentro do período **Pré-Tratamento**;
3. SEMANA 04 à SEMANA 07 – No **Período Pré-Tratamento**, os animais permaneceram em regime de colheita de sêmen semanal durante 24 dias (células em verde, figura 1), até o final da sétima semana;
4. SEMANA 08 à SEMANA 15 – durante o **Período Tratamento** (células em laranja, figura 1), os dois grupos de animais tratados receberam cinco aplicações de bST enquanto os outros 2 grupos receberam placebo e continuaram em regime de colheita de sêmen durante 56 DIAS;
5. SEMANA 16 à SEMANA 20 – após a última administração de bST e placebo, iniciou o período **Pós-Tratamento** (células em amarelo, figura 1), onde os animais permaneceram por mais 34 dias em regime de colheita de sêmen semanal, até o encerramento do período experimental.

Figura 1 – Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais. Pirassununga, 2004

5.5 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN

As colheitas de sêmen foram realizadas semanalmente através da técnica de eletroejaculação modelo Eletrojet[®] (Eletrovet, São Paulo, SP) durante 20 semanas. Antes de cada colheita foi realizada higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro, e interna com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen. O ejaculado obtido foi imediatamente encaminhado ao laboratório onde a amostra foi dividida em 2 alíquotas, sendo a primeira utilizada nas análises da motilidade e características morfológicas do sêmen. A alíquota restante foi destinada às dosagens de Testosterona e IGF1. O plasma seminal foi obtido por centrifugação em 2 etapas (ANEXO B). O sobrenadante final foi estocado à -20 °C para evitar proteólise até o momento das quantificações.

5.6 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

No laboratório o sêmen foi mantido em banho-maria a 37 °C, onde a avaliação da motilidade espermática foi realizada com aumento de 100 vezes, utilizando um microscópio de contraste de fase (ZEISS[®], mod. ICS-standard 25). A motilidade foi determinada pela deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula e determinada pela porcentagem de espermatozóides com movimento

progressivo. Em razão de seu caráter subjetivo, estas avaliações foram realizadas sempre por dois técnicos e foram avaliados pelo menos três campos e a estimativa final foi dada pela leitura do campo com melhores características.

5.7 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS ESPERMÁTICAS

Para a análise da morfologia espermática o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado (1 mL de formol para 2-5 gotas de sêmen conforme a concentração espermática). Cada amostra de sêmen foi avaliada utilizando-se a técnica da câmara úmida, sendo que uma gota do sêmen diluído foi depositada sobre lâmina, coberta por lamínula e analisada em microscópio de contraste de fase (marca Carl Zeiss, modelo ICS-Standard 25) com aumento de 1000 vezes sob óleo de imersão. A avaliação morfológica espermática foi procedida com a contagem de 200 espermatozóides, analisando-se as alterações de forma e estrutura e classificando-as conforme a seguir:

1. Defeitos Maiores: acrossoma (destacado, *knobbed*, lesado); gota protoplasmática proximal; cabeça: (subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, coloração anormal, contorno anormal, *pouch formation*); peça intermediária (fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogota); cauda (fortemente dobrada ou enrolada, dobrada com gota protoplasmática distal anexa);

2. Defeitos Menores: cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal, isolada normal); inserções abaxial, retroaxial e oblíqua; gota protoplasmática distal; cauda (enrolada, dobrada).

Para o estudo estatístico e apresentação dos resultados, as diferentes alterações morfológicas foram reagrupadas em: 1) defeitos de acrossoma; 2) ocorrência de gota protoplasmática proximal; 3) ocorrência de gota protoplasmática distal; 4) anomalias da cabeça do espermatozóide; 5) anomalias da cauda do espermatozóide; 6) defeitos de peça intermediária; e 7) defeitos espermáticos totais.

5.8 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE TESTOSTERONA

A determinação das concentrações de testosterona no plasma seminal foi realizada através de radioimunoensaio, utilizando-se kit comercial (DSL, Webster, Texas, USA), fornecido pela Genese (São Paulo, SP).

Após o descongelamento, 50 μL de cada amostra foram pipetados em duplicata nos tubos-teste e adicionados de 500 μL de $\text{T}[I^{125}]$. Após 60 minutos de incubação a 37 °C, os tubos tiveram seu conteúdo drenado e foi permitida a secagem por 5 minutos. Padrões e controles passaram pelo mesmo procedimento. Em seguida foi realizada a contagem de radiação em contador gama. Os resultados são apresentados em ng/mL.

A tabela 2 apresenta os índices de controle de qualidade para todos os ensaios realizados para dosagem de testosterona. Os resultados da validação dos ensaios para testosterona são apresentados no ANEXO C.

5.9 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE IGF1

Para a realização dos ensaios para quantificação de IGF1 foi utilizado o kit IRMA ACTIVE™ DSL-5600 (DSL, Webster, Texas, USA), fornecido pela Genese (São Paulo, SP).

O procedimento incluiu uma etapa de extração em ácido-etanol das amostras diluídas, onde a IGF1 foi separada de sua proteína carreadora presente. Nesta etapa, 50 µL das amostras foram pipetados em tubos de microcentrífuga e adicionados de 200 µL da solução de extração fornecida no kit. Após incubação por período de 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 3 minutos a 25°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um segundo tubo, onde foram adicionados 500 µL de solução de azida sódica fornecida no kit para promover a neutralização da primeira solução.

Na segunda etapa dos ensaios, 50 µL das amostras-teste, controle e padrões foram transferidas para tubos teste de polipropileno e adicionados de anti-IGF1 [I^{125}]. Em seguida as amostras foram incubadas durante 3 horas a 25°C em agitador ajustado para 180 rpm. Após a drenagem, os tubos permaneceram secando durante

2 minutos. Em seguida os tubos foram submetidos a três enxágües com 3 mL de água de ionizada e submetidos à contagem da radiação em contador gama. Os resultados são apresentados em ng/mL.

A tabela 3 apresenta os índices de controle de qualidade para todos os ensaios realizados para dosagem de IGF1. Os resultados da validação dos ensaios para IGF1 são apresentados no ANEXO D.

Tabela 2 – Controle de qualidade dos quatro ensaios para testosterona. Pirassununga, 2003

	ENSAIO			
	1	2	3	4
CPM Total	34835	33113,5	40057,5	39921,5
Cap. Ligação B/B0, %	35	35	30	30
L.N.E., %	0,65	0,64	0,47	0,53
Sensibilidade min., % (dose)	92,3 (0,02)	92,0 (0,03)	89,9 (0,03)	90,0 (0,03)
Sensibilidade máx., % (dose)	9,9 (25,0)	9,6 (25,0)	11,6 (23,0)	11,5 (22,8)
Cv Intraensaio Baixo, %	3,43	6,40	0,93	7,53
CV Intraensaio Alto, %	11,57	5,16	0,84	4,85
CV Interensaio Baixo, %		4,51		
CV Interensaio Alto, %		4,10		

Tabela 3 – Controle de qualidade dos quatro ensaios para IGF1. Pirassununga, 2003

	ENSAIO			
	1	2	3	4
CPM Total	64860	59944,5	50917,5	48670,5
Cap. Ligação B/B0, %	26	25	25	25
L.N.E., %	0,82	0,77	0,78	0,80
Sensibilidade mín., % (dose)	0,38 (1,3)	0,49 (0,9)	0,36 (2,4)	0,34 (1,3)
Sensibilidade máx., % (dose)	72,6 (597,2)	72,6 (685,0)	72,4 (582,6)	72,5 (617,8)
Cv Intraensaio Baixo, %	3,43	6,40	0,93	7,53
CV Intraensaio Alto, %	11,57	5,16	0,84	4,85
CV Interensaio Baixo, %		4,17		
CV Interensaio Alto, %		2,23		

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis dependentes gota protoplasmática proximal e distal não atenderam às premissas estatísticas e foram submetidas à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionada ainda do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

O quadro de análise de variância é apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Análise de Variância para delineamento com 4 tratamentos, 16 animais e 20 diferentes tempos de amostragem. Pirassununga, 2003

CV	GL
Tratamento	3
Insulação	1
BST	1
Interação	1
Bloco	3
Resíduo A	9
Parcela	15
Tempo	19
Tempo * tratamento	57
Tempo * bloco	57
Resíduo B	171
Sub-parcela	319

A apresentação dos resultados segue a mesma seqüência adotada no item Material e Métodos, sendo que os dados climatológicos e as temperaturas retal e escrotal não foram submetidas à análise estatística. Estas informações serviram somente como um indicador do estado térmico na região escrotal, auxiliando o monitoramento da insulação.

6.1 INSULAÇÃO TESTICULAR

No período que compreende uma semana antes do início do experimento e a última semana de colheita de sêmen, a temperatura máxima foi de 34,4°C, a mínima de 13,7°C, com média de temperatura de 22,7°C. As variações diárias da temperatura ambiental são ilustradas graficamente no ANEXO E.

Durante as 96 horas de insulação escrotal a temperatura retal média foi de 38,8 °C, enquanto a temperatura no interior da bolsa insuladora foi de 35,5°C (tabela 5). Neste período, a temperatura ambiental média diária foi de 23,5°C, com máxima observada no período de 32,7°C e mínima de 17,7°C.

Tabela 5 – Temperaturas (°C) retal e da superfície escrotal durante o período de insulação testicular térmica. Pirassununga, 2004

Tempo (horas)		Temperatura retal				Temperatura escrotal			
		24	48	72	96	24	48	72	96
Touro	A20*	--	--	--	--	--	--	--	--
	A67	39,1	38,5	39,1	38,5	35,7	33,3	36,9	34,5
	A99	39,1	38,8	38,8	39,2	36,3	33,2	36,6	35,4
	A120*	--	--	--	--	--	--	--	--
	A137*	--	--	--	--	--	--	--	--
	A144*	--	--	--	--	--	--	--	--
	A149	38,7	38,7	38,7	38,6	36,2	34,7	36,4	35,9
	A151	39,0	38,9	38,9	38,9	36,8	34,2	36,1	35,9
	A159	38,9	38,6	39,0	39,0	36,1	34,2	36,4	36,5
	B1A*	--	--	--	--	--	--	--	--
	B3	38,7	38,5	38,8	38,8	35,0	33,6	36,2	35,4
	B5*	--	--	--	--	--	--	--	--
	B18*	--	--	--	--	--	--	--	--
	B23*	--	--	--	--	--	--	--	--
	B25	38,7	39,0	38,9	38,7	35,7	34,3	36,2	35,8
	B91	39,1	38,6	39,1	38,7	36,1	33,0	36,6	35,7
	médias	38,9	38,7	38,9	38,8	36,0	33,8	36,4	35,6
	DP	0,17	0,16	0,13	0,20	0,47	0,54	0,23	0,51

* Animal do grupo não insulado.

As informações meteorológicas colhidas no período experimental mostram, temperaturas médias próximas aos 25°C por ocasião da insulação testicular, similarmente ao observado por Gabaldi (2000). Temperaturas excessivamente altas, como 35°C poderiam causar efeitos sistêmicos indesejáveis, além de provavelmente causarem aumento exagerado da temperatura no interior da bolsa insuladora.

As temperaturas retal e da superfície escrotal apresentaram-se conforme esperado, com valores similares aos citados por Gabaldi (2000). Vogler et al. (1993) observaram temperaturas da superfície escrotal entre 33,3 e 36,4°C num ambiente onde a temperatura variou entre -4,9 e 33,7°C. O período de insulação escolhido (96

horas) foi eficaz na promoção da insulação testicular, conforme observado nos efeitos sobre as características espermáticas. A análise de variância mostrou que os efeitos da insulação manifestaram-se em vários momentos do experimento para as várias características espermáticas estudadas.

6.2 DEFEITOS DE ACROSSOMA

O padrão de ocorrência de defeitos no acrossoma dos espermatozóides, por grupo, é mostrado na figura 1. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 6. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 7.

Figura 1. Ocorrência média de defeitos de acrossoma nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST) – Pirassununga, 2004

Tabela 6 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de defeitos de acrossoma (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	0,38$\pm$0,24	0,0 $\pm$ 0,0	0,12$\pm$0,12	0,75$\pm$0,60	0,31$\pm$0,16
2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0,00
3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0,00
4	0,0 $\pm$ 0,0	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,0 $\pm$ 0,0	0,06 $\pm$ 0,43
5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,38 $\pm$ 0,24	0,38 $\pm$ 0,24	0,19 $\pm$ 0,09
6	0,25 $\pm$ 0,14	2,25 $\pm$ 0,92	0,25 $\pm$ 0,144	2,00 $\pm$ 0,61	1,19 $\pm$ 0,35
7	0,12 $\pm$ 0,125	1,62 $\pm$ 0,554	0,38 $\pm$ 0,24	2,75 $\pm$ 0,92	1,22 $\pm$ 0,37
8	0,25 $\pm$ 0,25	2,12 $\pm$ 1,01	0,62 $\pm$ 0,32	1,62 $\pm$ 0,85	1,16 $\pm$ 0,36
9	0,12 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,37	0,62 $\pm$ 0,47	0,62 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,18
10	0,25 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,42	0,0 $\pm$ 0,0	0,60 $\pm$ 0,45	0,42 $\pm$ 0,16
11	0,25 $\pm$ 0,14	0,45 $\pm$ 0,17	0,12 $\pm$ 0,12	0,82 $\pm$ 0,32	0,41 $\pm$ 0,12
12	0,38 $\pm$ 0,38	0,28 $\pm$ 0,16	0,25 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,40	0,32 $\pm$ 0,13
13	0,12 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,38	0,38 $\pm$ 0,38	0,28 $\pm$ 0,13
14	0,12 $\pm$ 0,12	0,0 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 0,35	0,35$\pm$0,35	0,24 $\pm$ 0,12
15	0,50 $\pm$ 0,20	0,12 $\pm$ 0,12	0,0 $\pm$ 0,0	0,32 $\pm$ 0,32	0,24 $\pm$ 0,10
16	0,0 $\pm$ 0,0	0,12 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,50	0,40 $\pm$ 0,26	0,26 $\pm$ 0,14
17	0,38 $\pm$ 0,38	0,0 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,29	0,34 $\pm$ 0,16
18	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,125 $\pm$ 1,25	0,25 $\pm$ 0,25	0,48 $\pm$ 0,31
19	0,12 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,20	1,12 $\pm$ 0,63	0,50 $\pm$ 0,19
20	0,0 $\pm$ 0,0	0,38 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,50	0,88 $\pm$ 0,38	0,44 $\pm$ 0,16
MÉDIA	0,17 $\pm$ 0,04	0,480$\pm$0,10	0,35 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,12	0,43 $\pm$ 0,05

Tabela 7 – Probabilidades de efeitos insulação, somatotropina e interação para a característica defeitos de acrossoma nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,7142	0,4690	0,1649
2	1,0000	1,0000	1,0000
3	1,0000	1,0000	1,0000
4	1,0000	1,0000	0,1173
5	1,0000	0,0269	1,0000
6	0,0125	0,8402	0,8402
7	0,0123	0,2971	0,4991
8	0,0302	0,9135	0,4543
9	0,2791	0,2349	0,2791
10	0,0319	0,3319	0,9581
11	0,0541	0,5538	0,2799
12	0,9052	1,0000	0,5554
13	0,8227	0,5062	0,8227
14	0,5490	0,1351	0,9561
15	0,9067	0,4878	0,1257
16	0,9625	0,1681	0,6737
17	0,5763	0,3592	0,5763
18	0,9449	0,7823	0,4593
19	0,2435	0,0673	0,4269
20	0,1731	0,0800	1,000
MÉDIA	0,0349	0,1582	0,8562

A maior média de ocorrência de acrossomas anormais no período total ocorreu entre os animais que passaram por insulação (0,48% e 0,71% para os grupos INS e IST, respectivamente). A média de defeitos de acrossoma para animais do grupo controle ($0,17 \pm 0,04\%$) foi abaixo daquela verificada por Gabaldi (2000) em touros Nelore sadios com idade média de 25 meses (2%).

Animais das raças Canchim e Nelore apresentaram, segundo Barbosa (1987) alterações acrossômicas da ordem de $1,3 \pm 0,5\%$ e $0,4 \pm 0,2\%$, respectivamente. No período pré-insulação do presente estudo, a ocorrência de anormalidades no acrossoma foi semelhante para os quatro grupos experimentais. O percentual mais elevado ($0,75 \pm 0,6$), observado no grupo IST foi inferior àquela verificada por Barbosa (1987).

No gráfico da figura 1 é nítida a elevação de defeitos do acrossoma após a indução da degeneração térmica. O efeito da insulação nos grupos INS e IST não foi prontamente observado porque as alterações de acrossoma ocorrem na célula em estágio de espermátide, a qual ainda não estava na iminência de ser liberada na ejaculação. O período de início do aparecimento da anormalidade de acrossoma coincide com a descrição de Vogler et al. (1993), que registraram o início da incidência em torno de 9 dias pós-insulação. No presente estudo, isto ocorreu após 10 a 15 dias.

O efeito concentrou-se entre as semanas 06 ($P=0,0125$) e 10 ($P=0,0319$), na primeira metade do período de tratamento. No ápice da expressão da degeneração sobre o acrossoma (4 a 5 semanas pós-insulação), os valores para este defeito não ultrapassaram 3%, diferindo dos resultados observados em outro estudo do gênero. Gabaldi (2000) observou que touros da raça Nelore sujeitos ao mesmo tipo de

degeneração apresentaram, 3 semanas após a insulação testicular, 46,7% de células com acrossomas anormais.

A ausência de efeito insulação indicada pela análise de variância na semana 09 não deve ser considerada, podendo ser devida mais à elevação da média de defeitos do grupo BST. Mesmo quando as médias dos animais insulados reduziram-se para taxas abaixo de 1% (por volta da semana 10) a análise de variância detectou efeito deletério do calor. O gráfico da figura 1 esclarece que as células com acrossomas alterados em decorrência do efeito local do calor são evidenciadas entre 2 e 11 semanas após a instalação de degeneração térmica localizada. Vogler et al. (1993) notaram este tipo de defeito por volta de 4 semanas pós-insulação escrotal, com um percentual de *knobbed* acrossoma na ordem de $11,8 \pm 5,5\%$ para touros da raça Holandesa com média de 15 meses de idade.

É interessante reforçar que animais taurinos, como os utilizados no presente estudo, são reconhecidamente mais sensíveis aos efeitos da alta temperatura ambiente do que animais zebuínos. Entretanto, comparando-se os resultados obtidos com aqueles observados por Gabaldi (2000), não se comprovou tal evento.

No final do período experimental as probabilidades sugerem uma tendência à ocorrência do efeito de bST. Na semana 19 ($P=0,067$) a média para os animais tratados com bST (BST e IST) foi de 0,81% contra 0,18% para os não tratados (CON e INS). Na semana 20 ($P=0,080$), a média para os tratados com bST foi de 0,69% e para os não tratados foi de 0,19%. Porém, tais valores estão dentro da faixa admitida como normal ($\leq 5\%$) para a espécie (CBRA, 1998), o que desclassifica o possível efeito. Admite-se então, ausência de efeito bST no período pós-tratamento. Isto difere do observado por Sauerwein et al. (2000), os quais concluíram que a bST reduziu a porcentagem de células com acrossomas anormais de $20,7 \pm 1,0\%$ para

15,5 ± 1,3% no sêmen de touros da raça Simental utilizados em centrais de inseminação.

A variação nos achados de alterações acrossomais ao longo do período total deveu-se exclusivamente ao efeito insulação como demonstrado na figura 1 (Tempo*INS:P<0,0001). É nítido que os touros do grupo IST apresentaram perfil de anormalidades acrossômicas igual ao dos animais do grupo CON. Por outro lado, a curva para os animais do grupo BST apresentou um padrão semelhante à do grupo INS.

6.3 GOTA PROTOPLASMÁTICA PROXIMAL

A análise de variância para esta característica foi realizada com dados transformados na base logarítmica.

O padrão de ocorrência de gota protoplasmática proximal, por grupo, é mostrado na figura 2. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 8. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 9.

Figura 2. Ocorrência média de gota protoplasmática proximal nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST) – Pirassununga – 2004

Tabela 8 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de gota protoplasmática proximal (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	1,50 $\pm$ 0,54	0,75 $\pm$ 0,60	2,12 $\pm$ 1,07	1,75 $\pm$ 0,92	1,53 $\pm$ 0,39
2	1,25 $\pm$ 0,75	1,00 $\pm$ 0,41	1,50 $\pm$ 0,64	1,75 $\pm$ 0,48	1,38 $\pm$ 0,27
3	1,50 $\pm$ 1,19	0,75 $\pm$ 0,48	0,25 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,87	1,00 $\pm$ 0,38
4	4,375 $\pm$ 3,04	19,38 $\pm$ 15,78	2,38 $\pm$ 1,03	10,88 $\pm$ 4,96	9,25 $\pm$ 4,14
5	4,00 $\pm$ 3,03	7,50 $\pm$ 4,64	2,12 $\pm$ 1,36	6,38 $\pm$ 2,21	5,00 $\pm$ 1,47
6	1,00 $\pm$ 0,68	4,00 $\pm$ 1,51	1,50 $\pm$ 1,17	5,75 $\pm$ 1,89	3,06 $\pm$ 0,79
7	2,25 $\pm$ 1,92	1,75 $\pm$ 0,48	0,50 $\pm$ 0,20	3,38 $\pm$ 1,03	1,97 $\pm$ 0,57
8	2,50 $\pm$ 1,72	14,50 $\pm$ 3,28	1,62 $\pm$ 0,83	6,25 $\pm$ 2,95	6,22 $\pm$ 1,69
9	1,75 $\pm$ 1,42	5,00 $\pm$ 1,85	1,75 $\pm$ 0,95	1,38 $\pm$ 0,24	2,47 $\pm$ 0,68
10	0,58 $\pm$ 0,48	6,28 $\pm$ 2,93	1,50 $\pm$ 0,61	2,92 $\pm$ 1,71	2,82 $\pm$ 0,96
11	0,38 $\pm$ 0,38	3,05 $\pm$ 1,43	2,88 $\pm$ 1,89	4,10 $\pm$ 3,11	2,60 $\pm$ 0,95
12	0,50 $\pm$ 0,35	2,02 $\pm$ 0,75	0,38 $\pm$ 0,12	5,28 $\pm$ 4,62	2,04 $\pm$ 1,17
13	2,50 $\pm$ 0,68	0,88 $\pm$ 0,43	2,00 $\pm$ 1,35	6,45 $\pm$ 6,12	2,96 $\pm$ 1,51
14	2,00 $\pm$ 1,51	0,50 $\pm$ 0,20	5,00 $\pm$ 4,02	8,98$\pm$7,21	4,12 $\pm$ 2,05
15	5,00 $\pm$ 4,50	0,88 $\pm$ 0,32	1,12 $\pm$ 0,32	9,78 $\pm$ 8,78	4,19 $\pm$ 2,40
16	3,50 $\pm$ 1,56	2,00 $\pm$ 1,06	2,12 $\pm$ 1,26	10,82 $\pm$ 10,33	4,61 $\pm$ 2,54
17	6,62 $\pm$ 6,13	2,38 $\pm$ 0,97	2,62 $\pm$ 1,49	12,00 $\pm$ 11,83	5,91 $\pm$ 3,17
18	6,38 $\pm$ 4,55	3,50 $\pm$ 2,70	4,62 $\pm$ 3,82	8,12 $\pm$ 6,97	5,66 $\pm$ 2,18
19	5,50 $\pm$ 4,04	2,88 $\pm$ 2,40	4,38 $\pm$ 3,88	7,00 $\pm$ 5,68	4,94 $\pm$ 1,90
20	3,00 $\pm$ 2,84	2,12 $\pm$ 1,31	3,62 $\pm$ 2,80	5,00 $\pm$ 4,02	3,44 $\pm$ 1,33
MÉDIA	2,80 $\pm$ 0,56	4,06 $\pm$ 0,94	2,20 $\pm$ 0,40	5,97 $\pm$ 1,12	3,76 $\pm$ 0,41

Tabela 9 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica ocorrência de gota protoplasmática proximal nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,3111	0,1555	0,7288
2	1,0000	0,3235	0,6141
3	0,7163	0,7163	0,1679
4	0,1861	0,5384	0,7014
5	0,2361	0,6349	0,9049
6	0,0122	0,4880	0,7791
7	0,3648	0,9595	0,1920
8	0,0049	0,0725	0,1346
9	0,3086	0,2067	0,2067
10	0,0312	0,4081	0,1605
11	0,3127	0,3557	0,7002
12	0,2102	0,5281	0,4964
13	0,6457	0,4150	0,3331
14	0,7421	0,1501	0,4720
15	0,6689	0,6353	0,2435
16	0,4974	0,4830	0,3427
17	0,7166	0,6906	0,3453
18	0,9364	0,7146	0,4243
19	1,0000	0,6689	0,4591
20	0,9227	0,5024	0,6639
MÉDIA	0,2945	0,8168	0,7428

Os percentuais médios durante o período total do experimento para a presença de gota proximal nos espermatozóides de touros dos grupos que sofreram insulação (INS e IST) foram numericamente mais altos ($4,06 \pm 0,94$ e $5,97 \pm 1,12$, respectivamente), do que aqueles dos grupos não insulados (CON = $2,80 \pm 0,56$ e BST = $2,20 \pm 0,40$); todavia não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$). Médias semelhantes àsquelas obtidas dos animais não insulados são reportadas na literatura, sendo para animais da raça Nelore de $2,3 \pm 1,0\%$ (BARBOSA, 1987) e $2,0\%$ (GABALDI, 2000); e para a raça Canchim de $2,2 \pm 1,1\%$ (BARBOSA, 1987).

As médias iniciais observadas para gota proximal foram $1,53 \pm 0,39\%$ na semana 01, $1,38 \pm 0,27\%$ na semana 02 e $1,0 \pm 0,38\%$ na semana 03. Estas médias encontram-se na faixa esperada para a característica, indicando normalidade no perfil do sêmen de todos os grupos em relação à incidência de gota proximal e demonstrando boa homogeneidade entre os grupos.

A observação da figura 2 sugere efeito da insulação sobre o aparecimento de gota proximal na semana 04, particularmente para o grupo INS. Contudo, isto não foi comprovado pela análise de variância ($P = 0,1861$). O estudo da tabela 6.4 demonstra que os animais dos grupos insulados (INS e IST) apresentaram um grande aumento na porcentagem desta alteração da 3ª ($INS = 0,75 \pm 0,60$ e $IST = 1,50 \pm 0,87$) para a 4ª semana experimental ($INS = 19,38 \pm 15,78\%$ e $IST = 10,88 \pm 4,96\%$), coincidindo com as semanas pré e pós insulação testicular, respectivamente. Os animais principalmente do grupo INS apresentaram uma grande variação nos resultados individuais, indicando que as diferenças existentes neste ponto têm origem nas sensibilidades individuais dos touros. Aqui, a média para os oito animais insulados (INS e IST) foi de $15,1\%$, valor muito próximo à média registrada por Gabaldi (2000), que foi de

14% para touros Nelore sete dias após insulação testicular. Kastelic et al. (1996) relataram que, apesar da insulação testicular induzida ter triplicado o número de gotas protoplasmáticas em touros cruzados (Simental x Angus; 20 meses de idade), esta característica não mostrou sofrer efeito significativo do tratamento.

Os aumentos neste tipo de defeito foram inconsistentes, com altos valores de EPM em diversos momentos. Apesar das probabilidades sugerirem pouca influência da insulação no presente estudo, verificadas somente nas semanas 06 ($P=0,0122$), 08 ($P=0,0049$) e 10 ($P=0,0312$), vários autores reportam elevações em diferentes categorias de classificação de defeitos espermáticos (BRITO et al., 2004; KASTELIC et al., 1996; SKINNER; LOUW, 1966). Assim, quando Vogler et al. (1993) reportam a ocorrência de 10% de anormalidades secundárias no sêmen de touros da raça Holandesa num período de 9 dias após insulação (48 horas), significa que incluso neste percentual, encontra-se a presença de gota protoplasmática proximal. Segundo Skinner e Louw (1966), as intensidades da insulação produzem efeitos de diferentes intensidades sobre as anormalidades secundárias no sêmen de touros de raça européia com 18 meses de idade. Os autores relatam que 12 horas de temperatura elevada (40°C), resultam em aproximadamente 8% de anormalidades em uma a duas semanas pós-tratamento, elevando-se para 24% na terceira semana. Touros tratados por 24 horas apresentaram máximo de 8% ao longo de 8 semanas, indicando que o estresse térmico sistêmico de caráter agudo produz efeitos mais intensos sobre esta característica.

Não foram observados efeitos do tratamento bST para a presença de gota proximal durante todo o período experimental, sendo as médias dos animais tratados com bST (BST e IST) de 4,08%, e dos animais que não receberam o tratamento bST (CON e INS) de 3,43%.

Considerando a interação entre efeito tempo e insulação aqui observada ($P=0,0244$) e os registros da literatura, admite-se que a insulação testicular foi a causa das variações encontradas, apesar destas serem mais discretas que o esperado.

6.4 GOTA PROTOPLASMÁTICA DISTAL

A análise de variância foi realizada com os dados transformados na base logarítmica.

O padrão de ocorrência de gota protoplasmática proximal, por grupo, é mostrado na figura 3. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 10. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 11.

Figura 3. Ocorrência média de gota protoplasmática distal nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST) – Pirassununga – 2004

Tabela 10 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de gota protoplasmática distal (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	0,12 $\pm$ 0,12	1,62 $\pm$ 1,18	4,88 $\pm$ 4,55	1,75 $\pm$ 0,83	2,09 $\pm$ 1,16
2	0,50 $\pm$ 0,29	0,75 $\pm$ 0,48	1,00 $\pm$ 1,00	1,75 $\pm$ 0,75	1,00 $\pm$ 0,33
3	0,0 $\pm$ 0,0	1,50 $\pm$ 0,87	1,00 $\pm$ 1,00	7,00 $\pm$ 4,95	2,38 $\pm$ 1,34
4	3,62 $\pm$ 2,21	1,12 $\pm$ 0,66	4,88 $\pm$ 3,71	5,38 $\pm$ 4,06	3,75 $\pm$ 1,40
5	1,62 $\pm$ 0,80	0,0 $\pm$ 0,0	3,62 $\pm$ 2,72	0,25 $\pm$ 0,25	1,38 $\pm$ 0,74
6	0,12 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,38	2,62 $\pm$ 2,01	0,50 $\pm$ 0,29	0,91 $\pm$ 0,53
7	0,25 $\pm$ 0,25	0,0 $\pm$ 0,0	1,25 $\pm$ 0,78	0,12 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,22
8	1,00 $\pm$ 0,35	0,75 $\pm$ 0,48	2,75 $\pm$ 2,59	1,75 $\pm$ 1,03	1,56 $\pm$ 0,67
9	0,88 $\pm$ 0,32	1,82 $\pm$ 0,42	1,88 $\pm$ 1,09	2,00 $\pm$ 1,24	1,64 $\pm$ 0,40
10	0,38 $\pm$ 0,24	0,38 $\pm$ 0,24	1,50 $\pm$ 0,87	1,95 $\pm$ 0,61	1,05 $\pm$ 0,31
11	0,38 $\pm$ 0,24	0,38 $\pm$ 0,12	1,75 $\pm$ 0,97	1,50 $\pm$ 0,71	1,00 $\pm$ 0,32
12	0,50 $\pm$ 0,35	1,32 $\pm$ 1,23	0,25 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,20	0,72 $\pm$ 0,31
13	0,50 $\pm$ 0,20	1,62 $\pm$ 1,30	0,12 $\pm$ 0,12	4,20 $\pm$ 1,47	1,61 $\pm$ 0,60
14	0,75 $\pm$ 0,32	2,50 $\pm$ 1,43	0,62 $\pm$ 0,47	5,32$\pm$3,23	2,30 $\pm$ 0,94
15	3,00 $\pm$ 0,89	1,50 $\pm$ 0,84	0,38 $\pm$ 0,12	1,38 $\pm$ 0,43	1,56 $\pm$ 0,38
16	2,38 $\pm$ 1,31	0,88 $\pm$ 0,43	1,50 $\pm$ 1,19	1,82 $\pm$ 1,23	1,64 $\pm$ 0,51
17	0,50 $\pm$ 0,35	2,50 $\pm$ 1,70	0,25 $\pm$ 0,14	2,88 $\pm$ 2,88	1,53 $\pm$ 0,81
18	1,38 $\pm$ 0,52	5,62 $\pm$ 5,30	0,38 $\pm$ 0,38	1,62 $\pm$ 0,38	2,25 $\pm$ 1,30
19	2,50 $\pm$ 0,74	1,62 $\pm$ 0,97	0,25 $\pm$ 0,14	1,62 $\pm$ 0,55	1,50 $\pm$ 0,37
20	1,75 $\pm$ 1,03	3,38 $\pm$ 2,26	0,50 $\pm$ 0,29	1,62 $\pm$ 1,14	1,81 $\pm$ 0,67
MÉDIA	1,11 $\pm$ 0,18	1,48 $\pm$ 0,33	1,57 $\pm$ 0,37	2,26 $\pm$ 0,42	1,60 $\pm$ 0,17

Tabela 11 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica ocorrência de gota protoplasmática distal nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,7189	0,2940	0,3180
2	0,4724	0,2897	0,7163
3	0,1922	0,2528	0,4196
4	0,7431	0,3769	0,6243
5	0,1328	0,4760	0,5772
6	0,4120	0,2592	0,3042
7	0,1538	0,2345	0,3476
8	0,6994	0,4031	0,8163
9	0,5477	0,5119	0,6431
10	0,7042	0,0432	0,7042
11	0,8456	0,0760	0,8456
12	0,2971	0,5678	0,8477
13	0,0232	0,2776	0,1557
14	0,1322	0,5058	0,4683
15	0,7034	0,0589	0,0809
16	0,6308	0,9754	0,4595
17	0,2190	0,9723	0,8622
18	0,3299	0,3735	0,5880
19	0,7370	0,1535	0,1535
20	0,3223	0,2828	0,8532
MÉDIA	0,3285	0,4656	0,4884

As incidências médias de gota distal foram baixas para os quatro grupos, sendo de $1,11 \pm 0,18\%$, $1,48 \pm 0,33\%$, $1,57 \pm 0,37\%$ e $2,26 \pm 0,42\%$ para CON, INS, BST e IST, respectivamente.

Em animais normais, as médias encontradas para touros Canchin por Barbosa (1987) de $5,1 \pm 1,4\%$ e para touros Nelore por Barbosa (1987) de $2,0 \pm 0,6\%$ e por Gabaldi (2000) de 2,5% foram superiores àquelas encontradas para os touros do grupo CON, fato que pode ser explicado pelas diferenças raciais ou de idade dos animais.

O comportamento de todos os tratamentos foi adverso após a indução da degeneração testicular. Gabaldi (2000) registrou percentual de 4,5% (2,5% pré insulação) para gota distal uma semana após a insulação, sem observar aumento ao longo de mais 140 dias. No presente trabalho, não foi observado aumento significativo ($P > 0,05$) no percentual desta alteração nas primeiras semanas após insulação para os quatro grupos, sendo observado efeito estatístico da insulação ($P = 0,0232$) somente na semana 13 do experimento, quando foram obtidas médias de 2,91% para os animais insulados (INS e IST) e de 0,31% para os animais não insulados (CON e BST). Num período de 39 dias após insulação escrotal, Vogler et al. (1993), relataram que a insulação não elevou as anormalidades secundárias (incluindo gota distal) em touros da raça Holandesa a valores acima de 10%.

Por outro lado, na semana 13, o percentual de células com gota distal no grupo INS ($1,62 \pm 1,30$) esteve muito próximo daquele observado por Gabaldi (1,7%) no mesmo período pós insulação.

A ausência do efeito tempo ($P = 0,1752$) no estudo estatístico e os dados de literatura indicam que a insulação testicular durante 96 horas promove pouco ou nenhum aumento na quantidade de gota protoplasmática distal.

Na figura 3 é possível observar grande variação na ocorrência de gota distal para todos os tratamentos. O período de maior homogeneidade nos resultados ocorre entre o início do tratamento com somatotropina e a semana 12, coincidindo com a indicação de efeito bST na semana 10 ($P=0,04$).

Entretanto, não há relação entre este fato e a administração do hormônio já que os animais não tratados apresentaram comportamento semelhante e a análise de variância não mostrou indícios mais consistentes do efeito.

As diferenças entre as médias de incidência de gota protoplasmática distal são insignificantes ($P>0,05$), inexistindo também os efeitos tempo, insulação, bST e interações ao longo das 20 semanas de colheita de sêmen (figura 3).

6.5 DEFEITOS DE PEÇA INTERMEDIÁRIA

O padrão de ocorrência de defeitos de peça intermediária, por grupo, é mostrado na figura 4. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 12. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 13.

Figura 4. Ocorrência média de defeitos de peça intermediária nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

Tabela 12 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de defeitos de peça intermediária (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	0,25 $\pm$ 0,25	0,88 $\pm$ 0,43	0,0 $\pm$ 0,0	0,25 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,14
2	0,75 $\pm$ 0,25	1,00 $\pm$ 0,41	0,750 $\pm$ 0,48	0,0 $\pm$ 0,0	0,62 $\pm$ 0,18
3	0,75 $\pm$ 0,48	0,25 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 1,08	0,25 $\pm$ 0,25	0,81 $\pm$ 0,33
4	0,38 $\pm$ 0,24	2,12 $\pm$ 0,99	0,50 $\pm$ 0,29	0,62 $\pm$ 0,24	0,91 $\pm$ 0,30
5	0,12 $\pm$ 0,12	0,88 $\pm$ 0,43	0,62 $\pm$ 0,47	0,62 $\pm$ 0,24	0,56 $\pm$ 0,17
6	0,12 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,20	0,50 $\pm$ 0,20	1,75 $\pm$ 0,86	0,84 $\pm$ 0,26
7	0,25 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,48	0,38 $\pm$ 0,12	1,88 $\pm$ 0,72	0,81 $\pm$ 0,26
8	0,0 $\pm$ 0,0	0,88 $\pm$ 0,43	1,75 $\pm$ 1,13	3,00 $\pm$ 1,68	1,41 $\pm$ 0,54
9	0,25 $\pm$ 0,25	1,18 $\pm$ 0,59	0,50 $\pm$ 0,35	0,62 $\pm$ 0,32	0,64 $\pm$ 0,20
10	0,58 $\pm$ 0,27	1,20 $\pm$ 0,18	0,62 $\pm$ 0,38	1,40 $\pm$ 0,58	0,95 $\pm$ 0,19
11	1,00 $\pm$ 0,46	1,02 $\pm$ 0,35	2,00 $\pm$ 1,34	0,58 $\pm$ 0,34	1,15 $\pm$ 0,36
12	0,25 $\pm$ 0,14	1,32 $\pm$ 0,12	0,62 $\pm$ 0,32	1,10 $\pm$ 0,41	0,82 $\pm$ 0,16
13	0,62 $\pm$ 0,32	1,00 $\pm$ 0,35	0,62 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,54	0,81 $\pm$ 0,18
14	0,88 $\pm$ 0,72	1,38 $\pm$ 0,88	0,38 $\pm$ 0,24	1,02 $\pm$ 0,70	0,91 $\pm$ 0,32
15	1,12 $\pm$ 0,38	1,38 $\pm$ 0,52	0,25 $\pm$ 0,14	1,32 $\pm$ 0,85	1,02 $\pm$ 0,27
16	0,75 $\pm$ 0,48	0,88 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,35	1,48 $\pm$ 1,00	1,02 $\pm$ 0,27
17	0,62 $\pm$ 0,38	0,75 $\pm$ 0,43	0,62 $\pm$ 0,38	2,12 $\pm$ 1,09	1,03 $\pm$ 0,33
18	1,38 $\pm$ 0,38	1,25 $\pm$ 0,52	0,38 $\pm$ 0,12	1,25 $\pm$ 0,43	1,06 $\pm$ 0,20
19	0,38 $\pm$ 0,24	0,62 $\pm$ 0,24	0,25 $\pm$ 0,25	0,88 $\pm$ 0,72	0,53 $\pm$ 0,20
20	1,50 $\pm$ 0,54	1,00 $\pm$ 0,35	1,12 $\pm$ 0,52	1,25 $\pm$ 0,60	1,22 $\pm$ 0,23
MÉDIA	0,60 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,12	1,12 $\pm$ 0,16	0,87 $\pm$ 0,06

Tabela 13 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica anormalidades de peça intermediária nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,1570	0,1570	0,5247
2	0,5086	0,2019	0,2019
3	0,0947	0,3265	0,3265
4	0,0782	0,1791	0,1192
5	0,3598	0,7551	0,3598
6	0,0275	0,1978	0,6540
7	0,0391	0,1659	0,2585
8	0,2552	0,0539	0,8350
9	0,1962	0,6993	0,3152
10	0,1033	0,7536	0,8503
11	0,3058	0,6797	0,2898
12	0,0055	0,7334	0,1934
13	0,1516	1,0000	1,0000
14	0,2203	0,6558	0,9228
15	0,2568	0,4198	0,4701
16	0,6509	0,5239	0,7910
17	0,2327	0,3071	0,3071
18	0,4069	0,2759	0,2759
19	0,3171	0,8831	0,6606
20	0,7452	0,9135	0,5900
MÉDIA	0,0430	0,5232	0,8608

A ocorrência média de alterações na peça intermediária para os grupos CON, INS, BST e IST foram de $0,60 \pm 0,08\%$, $1,04 \pm 0,10\%$, $0,74 \pm 0,12\%$ e $1,12 \pm 0,16\%$, respectivamente. Os valores considerados normais para a raça Nelore e Canchim são, respectivamente $0,2 \pm 0,1\%$ e $0,1 \pm 0,1\%$ (BARBOSA, 1987).

As médias observadas no período pré-insulação distanciam-se daquelas citadas por Barbosa (1987). Entretanto, nenhum efeito foi detectado pela análise de variância no período total ($P>0.05$), o que inclui obviamente as 3 semanas iniciais. As médias para todos os tratamentos, exceto BST, encontram-se dentro do limite máximo de 1,0%, que representa muito pouco.

No período entre a insulação e o tratamento bST, as médias de peça intermediária anormal parecem variar (figura 4), mas a amplitude desta variação continuou sendo pequena. A maior média observada no período ($2,12 \pm 0,99\%$) ocorreu na semana 04 para o tratamento CON, encontra-se muito acima da ocorrida em touros da raça Nelore submetidos à insulação escrotal também por 96 horas (0,8%) observada por Gabaldi (2000). No prazo de 3 semanas pós-insulação, o maior valor de anormalidade da peça intermediária ocorreu entre 14 e 18 dias (2,4 e 3,0%, respectivamente). Dez dias após insulação escrotal de touros cruzados (Simental x Angus) apresentando 24 meses de idade, Kastelic et al. (1995) registraram aumento do percentual de defeitos da peça intermediária de menos de 5% para mais de 25%. Barth (1994) afirmou que a fase de pico de ocorrência de defeitos de peça intermediária possui duração de aproximadamente 12 dias e ocorre 11 dias pós-insulação. Ponto este que, corresponde no presente estudo, a semana 5 ($P=0,3598$), onde as médias para os grupos encontram-se bastante próximas e as curvas não apresentam um comportamento semelhante ao de um pico.

O efeito insulação praticamente inexistiu para esta característica, esboçando algum efeito nas semanas 06 ($P=0,0275$), 07 ($P=0,0391$) e 12 ($P=0,0055$). Nas semanas 06 e 07, houve maior incidência de alterações da peça intermediária, caracterizando o efeito da insulação, que incidiu principalmente sobre o grupo IST (médias de 1,75 e 1,87%, respectivamente), sendo altamente influenciado por um único animal. Na semana 12 a incidência desta alteração foi maior nos grupos insulados (INS e IST) do que nos não insulados (CON e BST), como notado na tabela 6.8.

A partir do início do tratamento com bST, as médias dos grupos parecem aproximar-se. Entretanto, os resultados obtidos não permitem dizer que ocorreu efeito do tratamento ($P>0,05$).

Após a interrupção do tratamento, as curvas de médias dos diferentes tratamentos encontram-se bastante próximas em relação ao início do experimento e as médias são similares àsquelas observadas por Gabaldi (2000) para períodos acima de 120 dias pós-insulação (entre 1,0 e 0,3%).

Na figura 4 pode-se visualizar que as alterações na peça intermediária sofreram muitas oscilações em todos os tratamentos ao longo do período experimental total. A análise de variância não detectou o efeito tempo, insulação, bST e interações ao longo das 20 semanas de colheita de sêmen.

6.6 ANOMALIAS DA CABEÇA DO ESPERMATOZÓIDE

O padrão de ocorrência de anomalias da cabeça do espermatozóide, por grupo, é mostrado na figura 5. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 14. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 15.

Figura 5. Ocorrência média de anomalias da cabeça do espermatozóide nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

Tabela 14 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de anomalias de cabeça (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST) Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	5,50 $\pm$ 3,71	4,00 $\pm$ 1,67	6,88 $\pm$ 4,68	6,12 $\pm$ 1,25	5,62 $\pm$ 1,44
2	7,75 $\pm$ 6,09	5,25 $\pm$ 2,06	5,75 $\pm$ 2,75	5,00 $\pm$ 0,41	5,94 $\pm$ 1,59
3	8,25 $\pm$ 4,50	5,25 $\pm$ 1,11	10,50 $\pm$ 3,71	5,00 $\pm$ 2,68	7,25 $\pm$ 1,57
4	5,38 $\pm$ 2,74	7,12 $\pm$ 1,28	9,12 $\pm$ 4,17	10,00 $\pm$ 4,63	7,91 $\pm$ 1,62
5	2,75 $\pm$ 0,48	40,50 $\pm$ 10,30	6,25 $\pm$ 2,95	64,38 $\pm$ 12,70	28,47 $\pm$ 7,55
6	2,00 $\pm$ 0,71	66,88 $\pm$ 2,35	6,12 $\pm$ 3,39	50,12 $\pm$ 5,59	31,28 $\pm$ 7,37
7	2,88 $\pm$ 1,07	66,25 $\pm$ 5,12	6,12 $\pm$ 5,14	57,62 $\pm$ 6,76	33,22 $\pm$ 7,79
8	3,12 $\pm$ 1,14	26,00 $\pm$ 4,30	7,25 $\pm$ 2,93	28,75 $\pm$ 11,71	16,28 $\pm$ 4,09
9	2,38 $\pm$ 0,66	17,58 $\pm$ 1,75	11,62 $\pm$ 4,77	23,88 $\pm$ 16,05	13,86 $\pm$ 4,29
10	2,82 $\pm$ 0,31	21,08 $\pm$ 8,87	9,38 $\pm$ 5,30	27,38 $\pm$ 12,47	15,16 $\pm$ 4,43
11	1,62 $\pm$ 0,52	8,35 $\pm$ 0,88	7,12 $\pm$ 2,55	25,38 $\pm$ 11,90	10,62 $\pm$ 3,57
12	9,12 $\pm$ 4,99	9,30 $\pm$ 3,24	16,25 $\pm$ 11,25	19,88 $\pm$ 10,89	13,64 $\pm$ 3,93
13	5,25 $\pm$ 1,65	8,62 $\pm$ 3,77	19,38 $\pm$ 10,27	17,88 $\pm$ 9,48	12,78 $\pm$ 3,61
14	5,62 $\pm$ 2,88	3,38 $\pm$ 1,55	14,75 $\pm$ 10,62	11,25$\pm$9,42	8,75 $\pm$ 3,46
15	8,00 $\pm$ 4,25	6,88 $\pm$ 3,45	21,75 $\pm$ 18,27	10,25 $\pm$ 7,61	11,72 $\pm$ 4,84
16	4,38 $\pm$ 1,56	4,50 $\pm$ 1,74	16,62 $\pm$ 12,49	11,25 $\pm$ 5,21	9,19 $\pm$ 3,34
17	5,62 $\pm$ 2,90	11,50 $\pm$ 5,73	17,50 $\pm$ 13,90	9,38 $\pm$ 4,41	11,00 $\pm$ 3,73
18	6,50 $\pm$ 4,10	6,62 $\pm$ 3,51	17,38 $\pm$ 14,21	8,88 $\pm$ 5,75	9,84 $\pm$ 3,81
19	7,62 $\pm$ 5,84	5,12 $\pm$ 2,16	14,75 $\pm$ 10,22	15,75 $\pm$ 12,13	10,81 $\pm$ 3,99
20	9,12 $\pm$ 2,84	6,00 $\pm$ 2,60	11,25 $\pm$ 7,96	13,75 $\pm$ 8,84	10,03 $\pm$ 2,89
MÉDIA	5,28 $\pm$ 0,68	16,51 $\pm$ 2,28	11,79 $\pm$ 1,82	21,09 $\pm$ 2,59	13,67 $\pm$ 1,04

Tabela 15 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica anomalias da cabeça do espermatozóide nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,7309	0,5944	0,9084
2	0,5804	0,7006	0,7645
3	0,0543	0,6154	0,5317
4	0,6818	0,3129	0,8908
5	0,0002	0,1287	0,2446
6	<0,0001	0,1408	0,0256
7	<0,0001	0,6401	0,3130
8	0,0058	0,5916	0,9139
9	0,0458	0,5992	0,8618
10	0,0527	0,4496	0,9881
11	0,0584	0,0823	0,3434
12	0,7600	0,1764	0,7814
13	0,8785	0,0815	0,6921
14	0,6074	0,1500	0,09104
15	0,4570	0,3193	0,5390
16	0,6633	0,1378	0,6485
17	0,8501	0,4212	0,2570
18	0,5714	0,3813	0,5601
19	0,9224	0,2663	0,8205
20	0,9418	0,2662	0,5165
MÉDIA	0,0185	0,1558	0,7949

A incidência de anomalias da cabeça do espermatozóide para o período total do experimento foi de $5,28 \pm 0,68$, $16,51 \pm 2,28$, $11,79 \pm 1,82$, $21,09 \pm 2,59\%$, para os grupos CON, INS, BST e IST, respectivamente. Gabaldi (2000) observou valores de 0,5% para esta característica em touros da raça Nelore com média de 25 meses de idade, muito abaixo daqueles observados neste estudo.

No período anterior a insulação testicular, as médias gerais das semanas 01, 02 e 03 são, respectivamente, $5,62 \pm 1,44$, $5,94 \pm 1,59$ e $7,25 \pm 1,57$, indicando boa homogeneidade entre os grupos experimentais.

O efeito da insulação ficou patente a partir da semana 05 ($P=0,0002$). Os defeitos de cabeça da ordem de 55-65% para os grupos de animais insulados caracterizaram um pico na semana 06 ($P<0,0001$) que coincide com o descrito por Barth (1993), em que o surgimento do pico de defeitos envolvendo a cabeça espermática ocorre 21-30 dias pós-insulação, com duração de aproximadamente 25 dias. Estes resultados vão de acordo com os observados por Vogler et al. (1993), os quais observaram acima de 80% de espermatozoides com defeitos primários (cabeça e acrossoma). Naquele estudo, foram utilizados touros da raça Holstein com média de 16 meses que apresentaram o pico de anormalidades primárias no dia 21 após um período de insulação de seis dias. Ambos resultados diferem daqueles obtidos por Gabaldi (2000), onde a autora mostra valores de 10% e 8,3% de defeitos da cabeça do espermatozóide no sêmen de touros Nelore. Também Kastelic et al. (1995) registraram médias abaixo de 20% no período de 20-30 dias após insulação escrotal de touros Simental x Angus.

Não foram observados efeitos ($P>0,05$) do tratamento com bST sobre as alterações morfológicas da cabeça espermática, com médias de 10,89% e 16,44% para os animais dos grupos não tratados e tratados com BST, respectivamente. Este

fato assegura que as oscilações observadas durante o período experimental foram devido a insulação.

6.7 ANOMALIAS DA CAUDA DO ESPERMATOZÓIDE

O padrão de ocorrência de anomalias da cauda do espermatozóide, por grupo, é mostrado na figura 6. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 16. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 17.

Figura 6. Ocorrência média de anomalias de cauda nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

Tabela 16 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de anomalias de cauda (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	4,75 $\pm$ 3,77	3,88 $\pm$ 1,88	3,62 $\pm$ 0,90	3,25 $\pm$ 0,52	3,88 $\pm$ 0,98
2	3,25 $\pm$ 1,80	5,50 $\pm$ 3,86	1,75 $\pm$ 1,44	0,75 $\pm$ 0,48	2,81 $\pm$ 1,11
3	2,00 $\pm$ 0,41	5,00 $\pm$ 2,52	4,25 $\pm$ 1,60	2,00 $\pm$ 0,91	3,31 $\pm$ 0,78
4	2,25 $\pm$ 0,75	25,00 $\pm$ 9,84	5,12 $\pm$ 3,39	12,25 $\pm$ 7,01	11,16 $\pm$ 3,61
5	1,50 $\pm$ 0,29	10,88 $\pm$ 4,33	2,62 $\pm$ 0,83	4,25 $\pm$ 1,25	4,81 $\pm$ 1,39
6	1,38 $\pm$ 0,43	2,00 $\pm$ 0,94	2,62 $\pm$ 0,83	2,88 $\pm$ 0,62	2,22 $\pm$ 0,36
7	2,88 $\pm$ 0,52	8,50 $\pm$ 1,19	2,62 $\pm$ 1,66	8,62 $\pm$ 2,06	5,66 $\pm$ 1,00
8	1,88 $\pm$ 0,38	9,20 $\pm$ 6,01	2,50 $\pm$ 0,61	6,50 $\pm$ 2,40	4,97 $\pm$ 1,64
9	3,62 $\pm$ 0,55	11,05 $\pm$ 4,34	7,25 $\pm$ 4,92	10,12 $\pm$ 3,71	8,01 $\pm$ 1,85
10	1,95 $\pm$ 0,52	9,58 $\pm$ 2,42	5,38 $\pm$ 3,90	13,05 $\pm$ 4,59	7,49 $\pm$ 1,81
11	1,62 $\pm$ 0,75	5,65 $\pm$ 1,57	12,12 $\pm$ 10,46	8,48 $\pm$ 3,25	6,97 $\pm$ 2,67
12	1,38 $\pm$ 0,43	11,08 $\pm$ 3,42	9,38 $\pm$ 7,88	8,40 $\pm$ 3,76	7,56 $\pm$ 2,31
13	2,00 $\pm$ 0,61	9,38 $\pm$ 3,98	8,12 $\pm$ 5,64	9,15 $\pm$ 3,48	7,16 $\pm$ 1,90
14	4,00 $\pm$ 1,22	11,00 $\pm$ 3,21	5,38 $\pm$ 2,97	4,48 $\pm$ 1,73	6,21 $\pm$ 1,31
15	4,38 $\pm$ 0,80	12,38 $\pm$ 5,34	2,25 $\pm$ 0,78	5,40 $\pm$ 1,10	6,10 $\pm$ 1,62
16	4,88 $\pm$ 1,53	12,50 $\pm$ 4,98	3,88 $\pm$ 1,09	8,95 $\pm$ 2,67	7,55 $\pm$ 1,60
17	3,00 $\pm$ 0,20	5,50 $\pm$ 1,72	2,38 $\pm$ 0,94	3,38 $\pm$ 0,83	3,56 $\pm$ 0,57
18	1,88 $\pm$ 0,66	5,12 $\pm$ 2,91	2,50 $\pm$ 0,61	2,88 $\pm$ 0,72	3,09 $\pm$ 0,77
19	2,75 $\pm$ 0,66	6,88 $\pm$ 3,29	1,88 $\pm$ 0,69	3,00 $\pm$ 0,89	3,62 $\pm$ 0,93
20	4,88 $\pm$ 2,20	4,12 $\pm$ 1,28	3,88 $\pm$ 1,42	5,50 $\pm$ 2,89	4,59 $\pm$ 0,93
MÉDIA	2,81 $\pm$ 0,28	8,70 $\pm$ 0,95	4,48 $\pm$ 0,79	6,16 $\pm$ 0,67	5,54 $\pm$ 0,38

Tabela 17 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica anomalias da cauda do espermatozóide nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,7817	0,6987	0,9116
2	0,7073	0,0845	0,3398
3	0,7644	0,7644	0,0589
4	0,0452	0,4620	0,2550
5	0,0326	0,2387	0,1091
6	0,4833	0,1095	0,7612
7	0,0060	0,9702	0,9108
8	0,0964	0,7615	0,6147
9	0,2205	0,7379	0,5751
10	0,0553	0,3470	0,9944
11	0,0267	0,5268	0,5364
12	0,4048	0,6066	0,3127
13	0,3311	0,4889	0,4573
14	0,2638	0,3405	0,1571
15	0,1086	0,1801	0,4584
16	0,0925	0,5170	0,7142
17	0,1705	0,2719	0,5391
18	0,2358	0,5829	0,3399
19	0,1198	0,1544	0,3518
20	0,7924	0,9101	0,4806
MÉDIA	0,0491	0,7999	0,2393

A média de anomalias de cauda durante o período total do experimento foi de $2,81 \pm 0,28\%$, $8,70 \pm 0,95\%$, $4,48 \pm 0,79\%$ e $6,16 \pm 0,67\%$ para os grupos CON, INS, BST e IST, respectivamente. O valor médio para touros sadios da raça Nelore citado por Gabaldi (2000) é aproximadamente 8,8%.

O percentual máximo observado nas primeiras semanas ocorreu para o grupo INS ($5,5 \pm 3,86\%$) e demonstrou bastante homogeneidade com os demais grupos.

O efeito insulação manifestou-se de forma contundente na semana 04 ($P=0,0452$), logo na primeira colheita pós-insulação. Os 25% de defeitos de cauda observados para o grupo INS coincidem com os 26% observados por Gabaldi (2000) no mesmo período. Entretanto, esta anomalia foi de caráter transitório, reduzindo-se a níveis equivalentes aos dos animais não insulados em apenas duas semanas. A resposta desta característica ao estresse térmico demonstrou um padrão um pouco distinto daquele indicado por Barth (1993), o qual afirma que o pico de ocorrência de defeitos de cauda enrolada surge em 23 dias após a insulação com duração de 23 a 30 dias.

O efeito insulação não foi mais identificado pela análise de variância por volta da terceira aplicação de bST. Contudo, exceto para os touros CON, as médias permaneceram ligeiramente acima das iniciais durante o período pós-tratamento.

As anormalidades da cauda do espermatozóide apresentaram-se de caráter temporário e não sofreram influência de bST ($P>0,05$), mesmo na presença de quadro degenerativo.

6.8 DEFEITOS ESPERMÁTICOS TOTAIS

O padrão de ocorrência de defeitos espermáticos totais, por grupo, é mostrado na figura 7. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 18. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 19.

Figura 7. Ocorrência média de defeitos espermáticos totais nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

Tabela 18 – Ocorrência média ($\pm$ EPM) de defeitos espermáticos totais (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	12,50$\pm$7,38	11,12$\pm$5,56	17,62$\pm$11,04	13,88$\pm$2,31	13,78 $\pm$ 3,32
2	13,5 $\pm$ 8,53	13,50 $\pm$ 5,20	10,75 $\pm$ 5,85	9,25 $\pm$ 1,70	11,75 $\pm$ 2,66
3	12,50 $\pm$ 4,33	12,75 $\pm$ 3,25	18,00 $\pm$ 7,11	15,75 $\pm$ 6,50	14,75 $\pm$ 2,54
4	16,00 $\pm$ 5,70	54,88 $\pm$ 10,56	22,12 $\pm$ 12,35	39,12 $\pm$ 16,27	33,03 $\pm$ 6,59
5	10,00 $\pm$ 3,23	59,75 $\pm$ 10,05	15,62 $\pm$ 8,14	76,25 $\pm$ 12,17	40,41 $\pm$ 8,34
6	4,875 $\pm$ 1,56	76,50 $\pm$ 2,61	13,62 $\pm$ 7,24	63,00 $\pm$ 6,48	39,5 $\pm$ 8,27
7	8,62 $\pm$ 2,68	78,88 $\pm$ 5,78	11,25 $\pm$ 7,98	74,38 $\pm$ 8,19	43,28 $\pm$ 9,11
8	8,75 $\pm$ 2,29	53,25 $\pm$ 5,81	16,50 $\pm$ 7,68	47,88 $\pm$ 10,28	31,59 $\pm$ 5,91
9	9,00 $\pm$ 2,15	37,18 $\pm$ 5,67	23,62 $\pm$ 7,91	38,62 $\pm$ 14,72	27,11 $\pm$ 5,04
10	6,50 $\pm$ 0,87	39,25 $\pm$ 6,42	18,38 $\pm$ 10,59	47,28 $\pm$ 12,25	27,85 $\pm$ 5,72
11	5,25 $\pm$ 0,66	18,88 $\pm$ 3,49	26,00 $\pm$ 16,90	40,80 $\pm$ 13,14	22,73 $\pm$ 5,87
12	12,12 $\pm$ 4,83	25,30 $\pm$ 5,68	27,12 $\pm$ 19,64	35,82 $\pm$ 14,77	25,09 $\pm$ 6,14
13	11,00 $\pm$ 1,97	21,75 $\pm$ 4,01	30,62 $\pm$ 17,20	39,00 $\pm$ 13,68	25,59 $\pm$ 5,69
14	13,38 $\pm$ 3,20	18,75 $\pm$ 5,09	26,62 $\pm$ 17,73	31,40$\pm$15,94	22,54 $\pm$ 5,78
15	22,00 $\pm$ 6,62	23,12 $\pm$ 6,23	25,75 $\pm$ 18,50	28,42 $\pm$ 16,10	24,82 $\pm$ 5,88
16	15,88 $\pm$ 4,49	20,88 $\pm$ 7,45	25,62 $\pm$ 13,95	34,70 $\pm$ 14,06	24,27 $\pm$ 5,16
17	16,75 $\pm$ 8,85	22,62 $\pm$ 9,84	23,88 $\pm$ 15,25	30,25 $\pm$ 15,02	23,38 $\pm$ 5,76
18	17,62 $\pm$ 9,33	22,25 $\pm$ 10,71	26,50 $\pm$ 18,51	23,00 $\pm$ 12,46	22,34 $\pm$ 5,97
19	18,88 $\pm$ 10,53	17,38 $\pm$ 4,88	22,00 $\pm$ 14,20	29,38 $\pm$ 17,89	21,91 $\pm$ 5,85
20	20,25 $\pm$ 7,46	17,00 $\pm$ 3,97	20,89 $\pm$ 11,49	28,00 $\pm$ 12,42	21,53 $\pm$ 4,35
MÉDIA	12,77 $\pm$ 1,23	32,25 $\pm$ 2,64	21,12 $\pm$ 2,65	37,31 $\pm$ 3,15	25,86 $\pm$ 1,36

Tabela 19 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica defeitos espermáticos totais nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,7172	0,5797	0,8663
2	0,8448	0,3717	0,8448
3	0,7571	0,2084	0,6995
4	0,0291	0,6658	0,3368
5	0,0003	0,2812	0,5869
6	<0,0001	0,6913	0,0869
7	<0,0001	0,9015	0,6400
8	0,0002	0,8505	0,3115
9	0,0178	0,3094	0,4003
10	0,0021	0,2006	0,7954
11	0,1632	0,0486	0,9513
12	0,2645	0,1984	0,8138
13	0,3240	0,0751	0,8997
14	0,6391	0,2470	0,9777
15	0,8559	0,6669	0,9409
16	0,4293	0,1990	0,8160
17	0,4943	0,4133	0,9774
18	0,9528	0,6152	0,6707
19	0,7889	0,4956	0,6867
20	0,7946	0,4418	0,4910
MÉDIA	0,0130	0,2757	0,7820

As médias gerais dos defeitos espermáticos totais para os grupos CON, INS, BST e IST foram $20,25 \pm 1,23\%$, $32,25 \pm 2,64\%$, $21,12 \pm 2,65\%$ e $37,31 \pm 3,15\%$, respectivamente. Os valores observados na literatura para os defeitos totais para touros normais com idade entre 25 e 27 meses são $25,3 \pm 4,9\%$ para a raça Canchim e $23,9\%$ para a raça Nelore (Barbosa, 1987).

O percentual de espermatozóides apresentando quaisquer anomalias variou entre aproximadamente 9% e 18% no início do experimento, antes da indução da degeneração testicular. Estes valores são considerados satisfatórios para a espécie estudada, estando dentro dos padrões aceitáveis (CBRA, 1998). A pequena diferença entre as médias dos tratamentos sugere pouca interferência da distribuição dos touros aos blocos.

O procedimento para indução da degeneração testicular foi correto, como pode se notar na figura 7, com o aumento da porcentagem total de defeitos espermáticos. A observação das probabilidades estatísticas confirma tal afirmativa.

O pico máximo de defeitos totais concentra-se na sétima semana pós-insulação, onde 76,6% das células espermáticas no sêmen dos touros insulados apresentaram um ou mais tipos de alteração morfológica. Em seu estudo, Gabaldi (2000) observou que as duas maiores médias ocorreram 7 e 8 semanas pós-insulação (valores de 91,0% e 91,2%, respectivamente). Há estudos que demonstraram que o número de células defeituosas pode chegar a 60% em apenas uma semana (Kastelic et al., 1995).

Além da insulação, a temperatura ambiente também é capaz de promover aumento significativo, como reportaram Johnston; Naelapaa; Frye Jr. (1936), ao demonstrar que 8 horas de temperatura elevada (40°C) durante uma semana produzem um aumento de 589% no total de células anormais em touros Pardo Suíço

com idade média de 3 anos. Os defeitos totais que apresentavam valor inicial de 9%, passaram para 13% uma semana após estresse térmico. Em seguida os valores de defeitos totais aumentaram para 53% (1-3 semanas após o estresse) e reduzindo para 33% depois de 4-6 semanas do estresse pelo calor.

O pico da curva de defeitos totais coincidiu com o início do período de tratamento sendo, portanto, sugerido que esta característica seja um indicador seguro da hipotética ação da bST sobre o epitélio germinativo. O comportamento das médias dos grupos INS e IST, somado à ausência de indicação de efeito de bST ou interação, confirmam a tendência observada ao longo da análise das várias características morfológicas estudadas.

Diferenças no percentual de espermatozóides anormais ao longo das 20 semanas (figura 7) ocorreram exclusivamente devido ao efeito insulação ($P < 0,0001$). O ápice dos efeitos da insulação ocorreu 3 semanas após a insulação ($P < 0,0001$). Este efeito persistiu até a semana 10 ($P = 0,0021$).

6.9 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

O padrão de motilidade espermática, por grupo, é mostrado na figura 8. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 20. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 21.

Figura 8. Motilidade espermática nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004.

Tabela 20 – Valores médios ($\pm$ EPM) de motilidade (%) no sêmen de touros dos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	58,8 $\pm$ 5,9	73,8 $\pm$ 1,2	68,8 $\pm$ 3,8	72,5 $\pm$ 1,4	68,4 $\pm$ 2,2
2	66,2 $\pm$ 3,8	71,2 $\pm$ 1,2	66,2 $\pm$ 5,9	70,0 $\pm$ 2,0	68,4 $\pm$ 1,8
3	71,2 $\pm$ 2,4	72,5 $\pm$ 2,5	72,5 $\pm$ 2,5	72,5 $\pm$ 1,4	72,2 $\pm$ 1,0
4	68,8 $\pm$ 2,4	56,2 $\pm$ 5,5	66,2 $\pm$ 4,3	62,5 $\pm$ 3,2	63,4 $\pm$ 2,2
5	70,0 $\pm$ 2,0	40,0 $\pm$ 7,4	67,5 $\pm$ 3,2	41,2 $\pm$ 7,2	54,7 $\pm$ 4,4
6	68,8 $\pm$ 3,8	26,2 $\pm$ 8,5	72,5 $\pm$ 1,4	36,2 $\pm$ 8,8	50,9 $\pm$ 5,9
7	68,8 $\pm$ 2,4	15,0 $\pm$ 13,4	70,0 $\pm$ 2,0	27,5 $\pm$ 10,3	45,3 $\pm$ 7,4
8	68,8 $\pm$ 2,4	30,0 $\pm$ 8,2	68,8 $\pm$ 3,2	13,8 $\pm$ 9,0	45,3 $\pm$ 6,9
9	67,5 $\pm$ 1,4	39,8 $\pm$ 16,0	68,8 $\pm$ 3,2	37,5 $\pm$ 13,6	53,3 $\pm$ 6,1
10	65,0 $\pm$ 5,0	22,5 $\pm$ 17,6	66,2 $\pm$ 2,4	41,2 $\pm$ 14,8	48,8 $\pm$ 7,1
11	70,0 $\pm$ 2,0	27,5 $\pm$ 16,4	62,5 $\pm$ 3,2	38,8 $\pm$ 14,3	49,7 $\pm$ 6,7
12	67,5 $\pm$ 1,4	52,5 $\pm$ 6,2	61,2 $\pm$ 3,2	44,1 $\pm$ 14,6	56,3 $\pm$ 4,6
13	67,5 $\pm$ 2,5	61,2 $\pm$ 4,3	63,8 $\pm$ 5,5	42,8 $\pm$ 14,6	58,8 $\pm$ 4,4
14	68,8 $\pm$ 2,4	61,2 $\pm$ 5,2	61,2 $\pm$ 10,5	49,4$\pm$15,6	60,2 $\pm$ 4,7
15	63,8 $\pm$ 3,8	67,5 $\pm$ 1,4	66,2 $\pm$ 3,8	49,7 $\pm$ 15,4	61,8 $\pm$ 4,1
16	65,0 $\pm$ 2,9	62,5 $\pm$ 3,2	55,0 $\pm$ 16,7	50,9 $\pm$ 15,8	58,4 $\pm$ 5,4
17	65,0 $\pm$ 4,6	63,8 $\pm$ 3,8	63,8 $\pm$ 9,7	48,8 $\pm$ 14,6	60,3 $\pm$ 4,5
18	63,8 $\pm$ 4,7	62,5 $\pm$ 4,3	61,2 $\pm$ 10,9	60,0 $\pm$ 7,1	61,9 $\pm$ 3,3
19	66,2 $\pm$ 3,8	66,2 $\pm$ 2,4	52,5 $\pm$ 13,0	53,8 $\pm$ 13,3	59,7 $\pm$ 4,6
20	66,2 $\pm$ 3,8	67,5 $\pm$ 2,5	53,8 $\pm$ 13,1	61,2 $\pm$ 7,7	62,2 $\pm$ 3,8
MÉDIA	66,9 $\pm$ 0,7	52,0 $\pm$ 2,6	64,4 $\pm$ 1,6	48,7 $\pm$ 2,8	58,0 $\pm$ 1,1

Tabela 21 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica motilidade espermática nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,0150	0,1950	0,1054
2	0,2022	0,8486	0,8486
3	0,7676	0,7676	0,7676
4	0,0186	0,5247	0,1570
5	0,0004	0,9071	0,7242
6	<0,0001	0,2622	0,5998
7	0,0003	0,4319	0,5178
8	<0,0001	0,2346	0,2346
9	0,0205	0,9771	0,8859
10	0,0083	0,3450	0,4059
11	0,0159	0,8705	0,4235
12	0,1037	0,4301	0,9048
13	0,1286	0,2052	0,3896
14	0,3008	0,3008	0,8098
15	0,3970	0,3155	0,1922
16	0,7366	0,2836	0,9360
17	0,3207	0,3207	0,3970
18	0,8529	0,7115	1,0000
19	0,9402	0,1398	0,9402
20	0,5235	0,1887	0,6467
MÉDIA	0,0125	0,5777	0,9360

Os valores médios de motilidade espermática para o período total do experimento para os tratamentos CON, INS, BST e IST foram, respectivamente, $66,9 \pm 0,7$, $52,0 \pm 2,6$, $64,4 \pm 1,6$ e $48,7 \pm 2,8\%$. Estes valores estão de acordo com aqueles reportados para touros da raça Canchim ($50,7 \pm 5,2\%$) por Barbosa (1987); raça Nelore (71,7%) por Gabaldi (2000); raça Angus ($76 \pm 1,9\%$) por Meyerhoeffer et al. (1985); raça Holstein (53,0%) e raça Pardo Suíça (48,0%) por Johnston, Naelapaa; Frye Jr. (1963).

A característica motilidade apresentou logicamente o mesmo padrão de médias observado para defeitos totais. O indicativo de que a alocação dos animais foi adequada, permitiu observar que a motilidade foi intensamente afetada pela degeneração testicular induzida após a colheita da semana 03.

Os valores mais baixos de motilidade observados para os tratamentos INS e IST foram respectivamente $15,0 \pm 13,4\%$ e $13,75 \pm 9,0\%$ e ocorreram nas semanas 07 e 08. A inflexão da curva de motilidade em resposta a insulação foi um pouco mais moderada neste estudo, se comparada aos valores de motilidade observados por Gabaldi (2000) durante 1 a 15 semanas pós-insulação. Uma semana após a insulação, por exemplo, a autora observou 19,5% de motilidade em razão da insulação, enquanto neste estudo a motilidade média de touros insulados encontrava-se acima de 40%.

Pela análise de variância pode-se observar que a bST não influenciou a motilidade ao longo do experimento ($P=0,1643$). De fato, as médias entre animais que receberam e não receberam bST são praticamente iguais (56,6% e 59,4%, respectivamente). Da figura 8, podemos inferir que a recuperação da normalidade da motilidade espermática foi similar entre animais insulados não tratados e aqueles tratados.

A amplitude e a persistência de baixos valores de motilidade, provavelmente em decorrência dos defeitos espermáticos, foi um quadro menos marcante no sêmen dos *Bos taurus* empregados neste estudo. Entretanto, o objetivo de simular uma condição patológica decorrente do estresse térmico localizado foi plenamente atingido.

A análise de variância confirma a ação da insulação sobre a motilidade espermática em diversos momentos do período estudado.

Ao final deste, animais insulados, independentemente de bST, apresentaram valores de motilidade próximos ao inicial, indicando capacidade regenerativa satisfatória, apesar de algumas variações individuais.

6.10 CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA NO PLASMA SEMINAL

O perfil das concentrações de testosterona no plasma seminal, por grupo, é mostrado na figura 9. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 22. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 23.

Figura 9. Concentrações de testosterona no plasma seminal nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST. Pirassununga, 2004.

Tabela 22 – Valores médios ($\pm$ EPM) de testosterona no plasma seminal de touros (ng/mL) nos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	0,54$\pm$0,48	0,68$\pm$0,36	0,94$\pm$0,68	0,59$\pm$0,25	0,69 $\pm$ 0,22
2	0,71 $\pm$ 0,40	0,48 $\pm$ 0,26	0,51 $\pm$ 0,20	1,38 $\pm$ 0,44	0,77 $\pm$ 0,18
3	0,38 $\pm$ 0,17	0,03 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,13	0,67 $\pm$ 0,32	0,35 $\pm$ 0,11
4	0,71 $\pm$ 0,21	1,65 $\pm$ 0,42	0,72 $\pm$ 0,17	1,35 $\pm$ 0,36	1,11 $\pm$ 0,17
5	0,92 $\pm$ 0,33	1,05 $\pm$ 0,52	0,57 $\pm$ 0,36	1,48 $\pm$ 0,84	1,01 $\pm$ 0,26
6	0,78 $\pm$ 0,41	1,86 $\pm$ 0,80	0,42 $\pm$ 0,14	0,54 $\pm$ 0,28	0,90 $\pm$ 0,26
7	0,61 $\pm$ 0,56	0,51 $\pm$ 0,15	0,27 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,69	0,56 $\pm$ 0,21
8	0,41 $\pm$ 0,26	0,38 $\pm$ 0,17	0,35 $\pm$ 0,20	0,23 $\pm$ 0,11	0,34 $\pm$ 0,09
9	0,55 $\pm$ 0,33	0,45 $\pm$ 0,23	0,30 $\pm$ 0,18	0,94 $\pm$ 0,35	0,56 $\pm$ 0,14
10	0,26 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,19	0,25 $\pm$ 0,10	1,18 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,16
11	0,50 $\pm$ 0,12	0,36 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,25	0,90 $\pm$ 0,30	0,58 $\pm$ 0,11
12	0,11 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,12	0,17 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,49	0,30 $\pm$ 0,13
13	0,23 $\pm$ 0,20	0,49 $\pm$ 0,23	0,19 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,08
14	0,32 $\pm$ 0,15	0,53 $\pm$ 0,20	0,19 $\pm$ 0,06	0,32$\pm$0,13	0,34 $\pm$ 0,07
15	0,48 $\pm$ 0,17	0,45 $\pm$ 0,30	0,13 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,19	0,37 $\pm$ 0,10
16	0,36 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,22	0,23 $\pm$ 0,04
17	0,14 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,04
18	0,13 $\pm$ 0,07	0,13 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,30	0,19 $\pm$ 0,16	0,21 $\pm$ 0,08
19	0,20 $\pm$ 0,17	0,27 $\pm$ 0,11	0,30 $\pm$ 0,11	0,54 $\pm$ 0,45	0,33 $\pm$ 0,08
20	0,36 $\pm$ 0,17	0,39 $\pm$ 0,23	0,28 $\pm$ 0,08	0,85 $\pm$ 1,13	0,47 $\pm$ 0,15
MÉDIA	0,43 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,08	0,36 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,04

Tabela 23 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica concentrações de testosterona no plasma seminal nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,8251	0,7245	0,5820
2	0,4024	0,3657	0,1727
3	0,9767	0,2302	0,0909
4	0,0424	0,6691	0,6492
5	0,3956	0,9437	0,5219
6	0,2455	0,1144	0,3363
7	0,6109	0,9837	0,4803
8	0,6881	0,5629	0,7994
9	0,3545	0,6738	0,2171
10	0,0784	0,0941	0,0906
11	0,7010	0,2233	0,3358
12	0,2843	0,3425	0,4695
13	0,5592	0,3070	0,4213
14	0,2609	0,2525	0,7954
15	0,3967	0,2630	0,3253
16	0,5486	0,5977	0,1123
17	0,5719	0,6429	0,2751
18	0,5835	0,3905	0,5988
19	0,3449	0,2636	0,5809
20	0,4000	0,5847	0,4519
MÉDIA	0,2003	0,8680	0,5543

As concentrações médias de T para o período total do experimento foram de $0,43 \pm 0,06$, $0,53 \pm 0,08$, $0,36 \pm 0,05$ e $0,68 \pm 0,09$ ng/mL para os tratamentos CON, INS, BST e IST, respectivamente. Estes valores diferem daqueles obtidos por Sauerwein et al. (2000). Os autores verificaram que as concentrações no plasma seminal de touros de raça européia oscilaram entre $1,9 \pm 0,5$ e $3,8 \pm 2,1$ ng/mL. No tecido testicular, Barth (1993) detectou concentrações em touros com 24 meses de idade variando entre 0,62 ng/mg e 2,44 ng/mg.

No plasma sanguíneo, a concentração média observada foi de $1,2 \pm 1,8$ ng/mL em touros da raça Canchim com idades entre 25 e 27 meses com variações entre 2,1 e 0,3 ng/mL. (BARBOSA, 1987). Em animais da raça Nelore com idade média de 25 meses, as concentrações variaram entre 0,41 e 11,91 ng/mL (GABALDI, 2000).

As concentrações observadas neste estudo assemelham-se a algumas observações da literatura. A análise pontual de várias colheitas mostra valores dentro do referido na literatura. Além do mais, o fluido pesquisado e a variabilidade entre raças, indivíduos e até mesmo o momento de colheita podem influenciar os resultados.

Nas 3 semanas iniciais, as médias de testosterona para os quatro grupos de touros foram consideradas homogêneas. Aparentemente houve algum efeito da insulação na semana 04 ($P=0,0424$), quando as médias das concentrações de T dos grupos INS e IST atingiu 1,50 ng/mL. Entre a instalação da bolsa insuladora e a primeira colheita de sêmen houve elevação nas concentrações de T, situação semelhante àquela observada por Gabaldi (2000), onde, um dia após o início da insulação, as concentrações médias subiram de valores pouco acima de 4 ng/mL para valores próximos a 5 ng/mL. Porém, cabe ressaltar que em seu estudo a

pesquisadora trabalhou com T sanguínea, onde a curva de resposta à insulação foi mais transitória. A representação gráfica feita nos dois trabalhos mostra curvas com comportamento semelhante, embora em escalas diferentes. Em ambos os casos reduções marcantes nas concentrações de T seguiram-se ao aumento inicial. A diferença é que naquele estudo (GABALDI, 2000) as concentrações atingiram valores próximos aos iniciais num período de sete dias. Aqui, devido às intensas flutuações, a curva das concentrações assume um caráter de declínio por volta de três semanas pós-insulação, coincidindo com o início do tratamento com bST. De fato, a maior probabilidade é a de que a frequência de colheita não seja capaz de detectar o período de variação hormonal.

A observação das probabilidades e médias nas demais semanas não indicam efeito insulação ($P>0,05$) nas outras semanas de colheita. A literatura assinala que a redução nas concentrações de T é de curta duração, com a secreção normal sendo restabelecida rapidamente (SETCHELL, 1998; GABALDI, 2000). Isto explica a ausência de efeito insulação.

Pela análise das tabelas 6.18 e 6.19, verifica-se que as probabilidades nas diferentes semanas acusam valores elevados em quase todos os momentos, possibilitando deduzir que as concentrações de testosterona no plasma seminal não são influenciadas pela administração de bST. Esta avaliação concorda com aquela obtida no estudo onde Sauerwein et al. (2000) avaliaram semanalmente três e duas colheitas de sêmen. Apesar de haver diferença significativa ($P<0,05$) nas concentrações plasmáticas de T entre touros tratados ($3,6 \pm 0,2$ ng/mL) e controle ($2,8 \pm 0,2$ ng/mL) no período de administração de bST (640 mg; frequência quinzenal; duração de 14 semanas), dentro do grupo de animais tratados não houve diferença ($P>0,05$) em quaisquer dos períodos estudados (pré-tratamento, 4

semanas; tratamento, 14 semanas; pós-tratamento, 6 semanas). No plasma seminal, em nenhum dos três períodos foi observada diferença entre tratamentos e entre touros.

Os resultados apresentados reforçam as indicações da literatura de que a redução nas concentrações de T são transitórias e que a aplicação de bST por períodos entre 10 e 15 semanas não influenciam na produção do hormônio.

6.11 CONCENTRAÇÕES DE IGF1 NO PLASMA SEMINAL

O perfil das concentrações de IGF1 no plasma seminal, por grupo, é mostrado na figura 10. Os valores semanais de média e erro padrão da média (EPM) são apresentados na tabela 24. As probabilidades estatísticas de efeito insulação, bST e interação são apresentados na tabela 25.

Figura 10. Concentrações de IGF1 no plasma seminal nos grupos controle (CON), insulação (INS), somatotropina (BST) e insulação / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

Tabela 24 – Valores médios ($\pm$ EPM) de IGF1 no plasma seminal de touros (ng/mL) nos grupos controle (CON), insulado (INS) somatotropina (BST) e insulado / somatotropina (IST). Pirassununga, 2004

SEMANA	TRATAMENTO				MÉDIA POR GRUPO
	CON	INS	BST	IST	
1	184,7$\pm$95,9	303,3$\pm$84,3	278,2$\pm$123,6	272,2$\pm$97,6	259,6 $\pm$ 46,8
2	270,2 $\pm$ 110,2	189,3 $\pm$ 70,4	225,0 $\pm$ 127,5	318,2 $\pm$ 137,5	250,7 $\pm$ 52,6
3	174,8 $\pm$ 80,4	252,4 $\pm$ 69,4	108,6 $\pm$ 67,1	199,8 $\pm$ 83,5	183,9 $\pm$ 36,3
4	297,2 $\pm$ 115,3	287,3 $\pm$ 112,3	184,0 $\pm$ 46,5	361,0 $\pm$ 93,4	282,4 $\pm$ 45,9
5	184,3 $\pm$ 61,2	103,5 $\pm$ 44,4	133,5 $\pm$ 83,9	262,8 $\pm$ 65,0	171,0 $\pm$ 33,0
6	202,7 $\pm$ 127,5	299,6 $\pm$ 52,8	181,3 $\pm$ 86,3	284,0 $\pm$ 67,6	241,8 $\pm$ 41,5
7	99,8 $\pm$ 39,9	285,1 $\pm$ 74,8	174,0 $\pm$ 83,3	303,6 $\pm$ 87,3	215,6 $\pm$ 39,4
8	44,1 $\pm$ 21,7	48,7 $\pm$ 37,7	64,6 $\pm$ 47,0	50,4 $\pm$ 11,6	51,9 $\pm$ 14,7
9	152,6 $\pm$ 86,3	40,4 $\pm$ 20,3	189,0 $\pm$ 124,9	284,6 $\pm$ 102,1	166,6 $\pm$ 47,0
10	69,7 $\pm$ 39,9	64,2 $\pm$ 50,8	90,8 $\pm$ 52,2	137,6 $\pm$ 27,6	90,6 $\pm$ 20,9
11	153,4 $\pm$ 82,7	40,1 $\pm$ 20,6	151,1 $\pm$ 134,6	372,1 $\pm$ 104,3	179,2 $\pm$ 52,7
12	41,4 $\pm$ 26,6	55,3 $\pm$ 30,1	161,7 $\pm$ 131,8	71,6 $\pm$ 23,2	82,5 $\pm$ 33,5
13	100,4 $\pm$ 52,0	39,8 $\pm$ 26,1	21,2 $\pm$ 3,8	98,0 $\pm$ 57,0	64,8 $\pm$ 20,4
14	121,1 $\pm$ 40,5	60,1 $\pm$ 20,5	24,2 $\pm$ 8,3	122,0$\pm$48,6	81,8 $\pm$ 18,5
15	142,5 $\pm$ 83,5	54,2 $\pm$ 20,2	27,2 $\pm$ 13,0	141,5 $\pm$ 44,8	91,3 $\pm$ 25,6
16	110,9 $\pm$ 44,2	18,3 $\pm$ 5,3	13,3 $\pm$ 7,8	109,1 $\pm$ 71,0	62,9 $\pm$ 22,4
17	126,5 $\pm$ 61,7	30,7 $\pm$ 15,1	95,4 $\pm$ 62,8	95,5 $\pm$ 24,2	87,0 $\pm$ 22,6
18	41,7 $\pm$ 15,3	26,9 $\pm$ 2,1	47,7 $\pm$ 21,8	53,6 $\pm$ 13,0	42,5 $\pm$ 7,1
19	68,8 $\pm$ 29,6	53,2 $\pm$ 22,0	30,8 $\pm$ 15,0	99,0 $\pm$ 42,6	62,9 $\pm$ 14,5
20	59,9 $\pm$ 17,2	61,3 $\pm$ 30,8	45,6 $\pm$ 18,4	45,9 $\pm$ 8,4	53,2 $\pm$ 9,3
MÉDIA	132,3 $\pm$ 15,8	115,7 $\pm$ 15,2	112,4 $\pm$ 17,4	184,1 $\pm$ 18,3	136,1 $\pm$ 8,5

Tabela 25 – Probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação para a característica concentrações de IGF1 no plasma seminal nas 20 semanas do período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA	PROBABILIDADES		
	INSULAÇÃO	BST	INTERAÇÃO
1	0,6208	0,7827	0,5845
2	0,9611	0,7396	0,4945
3	0,2948	0,4536	0,9311
4	0,4660	0,8608	0,4165
5	0,7322	0,4502	0,1612
6	0,3114	0,8497	0,9789
7	0,0876	0,5869	0,7426
8	0,8631	0,6926	0,7372
9	0,9285	0,1510	0,2745
10	0,6716	0,3423	0,5923
11	0,6098	0,1396	0,1349
12	0,6040	0,3604	0,4814
13	0,7829	0,7224	0,0400
14	0,5714	0,5913	0,0323
15	0,8056	0,7903	0,0794
16	0,9689	0,9344	0,0428
17	0,3170	0,7176	0,3165
18	0,7814	0,3209	0,5227
19	0,3881	0,8945	0,1823
20	0,9712	0,5300	0,9818
MÉDIA	0,5713	0,6179	0,3711

As concentrações médias de IGF1 para o período total do experimento foram de $132,3 \pm 15,8$ ng/mL (CON), $115,7 \pm 15,2$ ng/mL (INS), $112,4 \pm 17,4$ ng/mL (BST) e $184,1 \pm 18,3$ ng/mL (IST). As médias aqui observadas foram semelhantes às aquelas verificadas por Henricks et al. (1998) para touros sadios com idade entre 16 e 48 meses de idade (variações entre 87,37 e 179,4 ng/mL, com média geral de 116,3). Touros utilizados em programas de inseminação artificial com diferentes graus de fertilidade, com base em taxa de não retorno ao cio (NRR), apresentaram valores médios de 144 ± 9 ng/mL de IGF1 no plasma seminal, com amplitude variando entre 79 e 238 ng/mL (HOEFLICH et al., 1999), sem haver correlação com a NRR. A comparação dos valores observados neste estudo e os obtidos em literatura sugere que o método de extração empregado no RIA foi eficiente em eliminar a interferência das *binding proteins*.

Até o momento, não há conhecimento de estudos considerando a influência da degeneração testicular sobre as concentrações de IGF1 no plasma seminal. As médias das concentrações seminais observadas nos quatro grupos de touros no período anterior à insulação são mais homogêneas do que para o restante do experimento, e aproximam-se das verificadas por outros pesquisadores. Contudo, as médias observadas no período pós-insulação não apresentaram um padrão comparável ao pressuposto. Esperava-se que a degeneração testicular reduzisse significativamente as concentrações, já que Henricks et al. (1998) citam que o IGF1 encontrado no plasma seminal é de origem testicular ou epididimária. O padrão das concentrações variou de forma semelhante para todos os tratamentos ao longo do tempo (incluindo o grupo CON), apesar das diferenças nas magnitudes e o estudo estatístico não detectou efeito da insulação ($P > 0,05$). Dessa forma, é razoável

afirmar que as células responsáveis pela secreção local de IGF1 não foram afetadas pelo efeito insulação ou interferência de alguma produção extra-testicular.

A análise dos resultados obtidos neste estudo indica que alterações nas concentrações no período de tratamento com bST não se deram em decorrência do hormônio. Entretanto, esperava-se que animais tratados com a bST apresentassem médias de IGF1 relativamente mais elevadas, visto que, este é o efeito mais expressivo da administração do hormônio (MACDONALD; DEEVER; 1993; ANAPLIOTOU et al., 1996; SAUERWEIN et al., 2000; TATCHER; THOMPSON JUNIOR; 2002). Porém, a maioria dos estudos refere-se ao efeito positivo do GH nas concentrações de IGF1 periférica.

Sauerwein et al. (2000) concluíram que as concentrações de IGF1 no plasma sanguíneo de touros europeus são afetadas pela ST (640 mg, frequência quinzenal), aumentando de 577 ± 33 ng/mL antes de iniciar o período de tratamento (13 semanas) para 761 ± 27 ng/mL durante as semanas de aplicação.

Thatcher e Thompson (2002) observaram que cavalos castrados recebendo aplicações diárias de somatotropina eqüina (40 µg/kg) tiveram aumento contínuo nas concentrações plasmáticas de IGF1, que variaram de aproximadamente 150 ng/mL antes da primeira aplicação para valores acima de 500 ng/mL após 25 dias de tratamento. Animais que foram tratados diariamente tiveram aumento inicial semelhante ao primeiro grupo (100-150 ng/mL), mas que não atingiu a mesma amplitude no último dia (menos de 300 ng/mL).

MacDonald e Deaver (1993) concluíram que o efeito da aplicação diária de bST (0,2 mg/kg de peso metabólico) sobre a IGF1 é influenciado pela idade, ao verificarem que bovinos de 24 meses respondem com concentrações mais elevadas (acima de 450 ng/mL) que animais de 12 meses (abaixo de 250 ng/mL). Acredita-se

que este fator não tenha exercido influência, visto que os animais empregados no presente estudo encontram-se em uma faixa etária mais elevada, além de serem homogêneos com relação à idade.

ANAPLIOTOU et al. (1996) observaram que, em humanos, apesar das concentrações de IGF1 na circulação sanguínea triplicarem, a administração diária de GH (durante 8 dias) não promoveu alterações no plasma seminal e que não houve relação entre as concentrações de IGF1 nos dois fluidos. Os pesquisadores julgaram que as flutuações observadas nas concentrações seminais são aleatórias. Isto coincide com os resultados aqui apresentados, apesar da diferença entre a duração do tratamento e a espécie estudada.

Algumas interações entre bST e insulação foram detectadas no final do período de tratamento com bST (semanas 13 a 16), sugerindo que na presença de insulação, a bST promoveu aumento nas concentrações de IGF1. Contudo, a constatação não encontra explicação biológica plausível, já que não há fatores em comum aos grupos com médias próximas. Ao estudar a tabela 6.20, nota-se que nesta fase os EPM estão elevados, levando a crer que as variações individuais promoveram este fenômeno.

Em síntese, as oscilações nas concentrações médias observadas ao longo das 20 semanas não foram causadas pela insulação, bST ou interação entre estes dois fatores. Na figura 10, nota-se que tais oscilações tiveram um padrão ligeiramente semelhante, mas com algumas flutuações momentâneas. O tempo exerceu influência sobre as concentrações seminais de IGF1, de modo que as médias finais para todos os tratamentos foram reduzidas em relação às médias das primeiras semanas.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observado que:

- As concentrações de testosterona no plasma seminal que, no período inicial eram homogêneas entre os grupos, foram reduzidas de forma pouco significativas após a insulação testicular e passaram a demonstrar um perfil mais heterogêneo de oscilação entre os animais insulados;
- Observou-se um padrão das concentrações de IGF1 no plasma seminal semelhante ao da testosterona durante o período inicial, com resposta pouco significativa a insulação testicular e, nos touros insulados que receberam somatotropina, aumento transitório durante o período de aplicação;
- A motilidade espermática, inicialmente normal para todos os grupos, foi francamente reduzida após a insulação, em seqüência aos nítidos aumentos nas alterações morfológicas dos espermatozóides, com resposta inexpressiva ao tratamento com somatotropina;
- As características morfológicas e motilidade espermática foram afetadas pela degeneração testicular num período entre uma e sete semanas após a insulação testicular, havendo regressão espontânea do quadro espermático próximo ao normal num prazo de quinze semanas após a insulação testicular;
- A recuperação do quadro espermático manifestou-se de forma mais consistente após dez semanas para a maioria das características morfológicas, independentemente da administração de somatotropina.

Estas constatações permitem concluir que a bST, utilizada na dose de 1,2 mg/kg de peso corporal, não produziu efeitos significativos na motilidade, morfologia espermática, bem como nas concentrações seminais de T e IGF1. Portanto, a bST foi ineficaz no tratamento de touros Simental que passaram por degeneração testicular.

REFERÊNCIAS

ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; HOTSTON MOORE, A. Effects of insulin-like growth factor-1 on luteinizing hormone secretion in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 45-56, 1997.

ADAS, M. **Os climas do Brasil**. São Paulo: Moderna, 1983. p. 84-89: Panorama geográfico do Brasil: aspectos físicos, humanos e econômicos.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, p. 380-403, 1983. Supplement 2.

ANAPLIOTOU, M.G.; EVAGELLOU, E.; KASTANIAS, I.; LIPARAKI, M.; PSARA, P.; GOULANDRIS, N. Effect of growth hormone cotreatment with human chorionic gonadotropin in testicular steroidogenesis and seminal insulin-like growth factor-1 in oligozoospermia. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 2, p. 305-311, 1996.

ANDERSSON, B.E.; JÓNASSON, H. Regulação da Temperatura Ambiental. In: SWANSON, J.M.; REECE, W.O. (Ed.). **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 805-813.

ARAMBEPOLA, N.K.; BUNICK, D.; COOKE, P.S. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. **Journal of Endocrinology**, v. 156, p. 43-50, 1998a.

ARAMBEPOLA, N.K.; BUNICK, D.; COOKE, P.S. Thyroid hormone and follicle stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 4489-4495, 1998b.

ASHDOWN, R.R.; HAFEZ, E.S.E. Anatomia da Reprodução Masculina. In: **Reprodução Animal**. HAFEZ, E.R. (Ed.) 6. ed. São Paulo: Editora Manole, 1995, p. 3-13.

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland secretion. **International Review of Cytology**, v. 121. p. 127-231, 1990.²

AUSTIN, J.W.; HUPP, E.W.; MURPHREE, R.L. Effect of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 307-310, 1961.

AWONIYI, C.A.; SANTULLI, R.; SPRANDO, R.L.; EWING, L.L.; ZIRKIN, B.R. Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinology**, v. 124, n. 3, p. 1217-1223, 1989a.

AWONIYI, C.A.; SANTULLI, R.; CHANDRASHEKAR, V.; SCHANBACHER, B.D.; ZIRKIN, B.R. Quantitative restoration of advanced spermatogenic cells in adult male rats made azoospermic by active immunization against luteinizing hormone or gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 125, p. 1303-1309, 1989b.

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

BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993. Suplemento.

BARTH, A.D. e BOWMAN, P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 93-102, 1994.

BERNIER, M.; CHATELAIN, P.; MATHER, J.P.; SAEZ, J.M. Regulation of gonadotropin receptors, gonadotropin responsiveness and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 129, p. 257-263, 1986.

BLANCHARD, T.L. e JOHNSON, L. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell: Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. **Theriogenology**, v. 47, p. 665-677, 1997.

¹ RENNIE, P.S.; BOUFFARD, R.; BRUCHOVSKY, N.; CHENG, H. **Biochemistry Journal**, v. 221, p. 171, 1984.

BREIER, B.H. VICKERS, M.H.; GRAVANCE, C.G.; CASEY, P.J. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growing factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. **Endocrinology**, v. 137, n. 9, p. 4061-4064, 1996.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.G.; KASTELIC, J.P. Effect of age and genetic group on characteristics of scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511-528, 2004.

BUONOMO, F.C.; KLINDT, J. Ontogeny of insulin-like growth factors I and II and growth hormone in genetically lean and obese swine. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, p. 257, 1993.

BYSKOV, A.G. Primordial germ cells and regulation of meiosis. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in Mammals: germ cells and fertilization**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 1-16.

CASADY, R.B.; MYERS, R.M.; LEGATES, J.E. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 14-23, 1953.

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

CHUZEL, F.; CLARK, A.M.; AVALLET, O; SAEZ, J.M. Transcriptional regulation of the lutotropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 239, p. 8-16, 1996.

CLEMMONS, D.R. Roles of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 19-24, 1998.

COHEN, P.; GRAVES, H.C.B.; PEEHL, D.M.; KAMAREI, M.; GIUDICE, L.C.; ROSENFELD, R.G. Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 75, p. 1046-1053, 1992.

DAVIES, S.C.; WASS, J.A.; ROSS, R.J. *et al.* The induction of a specific protease for insulin-like growth factor binding protein-3 in the circulation during severe illness. **Journal of Endocrinology**, v. 130, p. 469-473, 1991.

DEAVER, D.R.; BRYAN, K.A. Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 287-297, 1999.

DUNSHEA, F.R.; KING, R.H.; OWENS, P.C.; WALTON, P.E. Moderate doses of porcine somatotropin do not increase plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) or IGF binding protein-3. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 149-157, 1999.

FLORES, J.M; SANCHEZ, M.A.; GONZALEZ, M.; PIZARRO, M. Caprine testicular hypoplasia with sexual reversion decreases expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) mRNA in testes. **Animal Reproduction Science**, v. 52, p. 279-288, 1998.

FOWLKES, J.; FREEMARK, M. Evidence for a novel insulin-like growth factor (IGF)-dependent protease regulating IGF-binding protein-4 I dermal fibroblasts. **Endocrinology**, v. 131, p. 2071-2076, 1992.

FRANÇA, L.R.; SILVA JÚNIOR., V.A.S.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S.K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1629-1636, 2000.

GABALDI, S.H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos a insulação escrotal**. 1999. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides. In: **Reprodução Animal**. HAFEZ, E.R. (Ed.) 6. ed. São Paulo: Editora Manole, 1995, p. 187-211.

GELBER, S.J.; HARDY, M.P.; MENDISHANDAGAMA, S.M.L.C.; CASELA, S.J. Effects of insulin-like growth factor-I on androgen production by highly pubertal and adult rat Leydig cells. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 125-130, 1992.

GLANDER, H.J.; KRATZSCH, J.; WEISBRICH, C.; BIRKENMEIER, G.; Insulin-like growth factor-I and alpha-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. **Human Reproduction**, v. 11, p. 2454-2460, 1996.

GRANNNER, D.K. Hormônios das gônadas. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1998. p.566-580.

GRAVANCE, C.G.; BREIER, B.H.; VICKERS, M.H.; CASEY, P.J. Impaired sperm characteristics in postpubertal growth-hormone-deficient dwarf (dw/dw) rats. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 71-6, 1997.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Mecanismos Comportamentais e Motivacionais do Cérebro – O Sistema Límbico e o Hipotálamo. In: _____. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 675-684.

HAFEZ, E.S.E. Anatomia da Reprodução Masculina. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução Animal**, 7. ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. p. 3-12.

HALL, P.F. Testicular steroids synthesis: organization and regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.) **The Physiology of Reproduction**, 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 1335-1357.

HENRICKS, D.M. Biochemistry and Physiology of the Gonadal Hormones. In: CUPPS, P.T. (Ed.) **Reproduction in Domestic Animals**, 4. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 81-118.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; BOONE, W.R.; GRAY, S.L. Identification of insulin-like growing factor in bovine seminal plasma and its receptors on spermatozoa: influence on sperm motility. 1. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 330-337, 1998.

HINEY, J.K.; SRIVASTAVA, V.; NYBERG, C.L.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. **Endocrinology**, v. 137, n. 9, p. 3717-3728, 1996.

HOEFLICH, A.; REICHENBACH, H.-D.; SCHWARTZ, J.; GRUPP, T.; WEBER, M.M.; FÖLL, J.; WOLF, E. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 39-51, 1999.

HOWARDS, S.S. Treatment of male infertility. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 312-317, 1995.

HUANG, Z.H.; BAXTER, R.C.; HUGHES, S.M.; MATSON, P.L.; LIEBERMAN, B.A.; MORRIS, I.D. Supplementary growth hormone treatment of women with poor response to exogenous gonadotrophins: changes in serum and follicular fluid insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding protein-3 (IGFBP-3). **Human Reproduction**, v. 8, p. 850-857, 1993.

JENNISCHE, E.; SKOTTNER, A.; HANSON, H.A. Dynamic changes in insulin-like growth factor I immunoreactivity correlate with repair events in rat ear after freeze-thaw injury. **Experimental Molecular Pathology**, v. 47, p. 193-201, 1987.

JEULIN, C.; LEWIN, L.M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal function of mammalian spermatozoa. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 2, p.87-102, 1996.

JOHNSON, L. Review article: spermatogenesis and aging in human. **Journal of Andrology**, v. 7, p. 331-354, 1986.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. (Ed.) **Reproduction in Domestic Animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 173-219.

JOHNSTON, J.E.; NAELAPAA, H.; FRYE JUNIOR., J.B. Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi bulls exposed to high temperatures and humidities. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 432-436, 1963.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: _____. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 355-366.

KASTELIC, J.P.; COULTER, G.H.; COOK, R.B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 44, p. 147-152, 1995.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; SAACK, R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.45, p. 935-942, 1996.

KHALID, M.; HARESIGN, W. Relationships between concentrations of ovarian steroids, insulin-like growth factor-1 and IGF-binding proteins during follicular development in the ewe. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 119-129, 1996.

KHAN, S.; TEERDS, K.; DORRINGTON, J. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 335-341, 1992.

KOK-ONN LEE.; OH, Y.; GIUDICE, L.C.; COHEN, P.; PEEHL, D.M.; ROSENFELD, R.G. Identification of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) Fragments and IGFBP-5 Proteolytic Activity in Human Seminal Plasma: A comparison of Normal and Vasectomized Patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 79, n. 5, p. 1367-1372, 1994.³

LAUDAT, A.; GUECHOT, J.; PALLUEL, A.M. Seminal androgen concentrations and residual sperm cytoplasm. **Clinica Chimica Acta**, v. 276, p. 11-18, 1998.

LE ROY, C.; LEJEUNE, H.; CHUZEL, F.; SAEZ, J.M; LANGLOIS, D. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. **Steroid Biochemistry e Molecular Biology**, v. 69, p. 379-384, 1999.

LEE, C.N. Environmental stress effects on bovine reproduction. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 2, p. 263-273, 1993.

LIN, T.; HASKELL, J.; VINSON, N.; TERRACIO, L. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary cultures. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 137, p. 950-956, 1986a.

LUNSTRA, D.D.; COULTER, G.H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 767-774, 1997.

² COHEN, P.; PEEHL, D.M.; LIU, F.; BAKER, B.; HINTZ, R.L.; ROSENFELD, R.G. Insulin-like growth factor axis abnormalities in cultures of prostate stromal cells from patients with benign prostatic hypertrophy. **Proceedings of the 75th Annual Meet of the Endocrine Society**, p. 482, 1993. Abstract..

MACDONALD, R.D.; DEEVER, D.R. Testicular development in bulls treated with recombinant bovine somatotropin. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1540-1545, 1993.

MACKAY, S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. **International Review of Cytology**, v. 200, p.47-99, 2000.

MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; O'DONNELL, L.; KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 148, p. 1-9, 1996.

MEYERHOEFFER, D.C.; WETTEMANN, R.P.; COLEMAN, S.W. WELLS, M.E. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 352-357, 1985.

MOHSENI-ZADEH, S. e BINOUX, M. Insulin-like Growth Factor (IGF) Binding Protein-3 interacts with the Type 1 IGF Receptor, reducing the Affinity of the Receptor for its Ligand: an Alternative Mechanism in the Regulation of IGF Action. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5645-5648, 1997a.

MOHSENI-ZADEH, S. e BINOUX, M. The 16-kDa proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the mitogenic action of fibroblast growth factor on mouse fibroblasts with targeted disruption of the type 1 IGF receptor gene. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 3069-3072, 1997b.

MOORE, A.; MORRIS, I.D. The involvement of insulin-like growth factor I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstium. **Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 107-114, 1993.

OH, S.S.; KHANDORI, R.; KOPPLIN, D.K.; AMADOR, A.G. Effects of somatostatin and somatotropin on the in vitro testicular steroidogenesis in hamster. **Revista Espanhola de Fisiologia**, v. 51, n. 4, p. 187-192, 1995.

OHYAMA, K.; OHTA, M.; NAKAGAMI, Y.; SANO, T.; SHIMURA, Y.; SATO, K.; NAKAZAWA, S. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on testosterone secretion in premature male rats. **Endocrinology Journal**, v. 42, p. 817-820, 1995.

OVESEN, P.; MOLLER, J.; JORGENSEN, J.O.; CHRISTIANSEN, J.S. Effect of growth hormone administration on circulating levels of luteinizing hormone, follicle

stimulating hormone and testosterone in normal healthy men. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1869-1872, 1993.

OVESEN, P.; JORGENSEN, J.O.; INGERSLEV, J.; HO, K.K.; ORSKOV, H.; CHRISTIANSEN, J.S. Growth hormone treatment of subfertile males. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 2, p. 292-298, 1996.

PERRARD-SAPORI, M.H.; CHATELAIN, P.G.; JAILLARD, C.; SAEZ, J.M. Characterization and regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I (Sm-C/IGF-I) receptors on cultured pig Leydig cells. Effects of Sm-C/IGF-I on luteotropin receptors and steroidogenesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 165, p. 209-214, 1987.

PLYMATE, S.R.; ROSEN, C.J.; PAULSEN, C.A.; WARE, J.L.; CHEN, J.; VESSELA, R.E.; BIRNBAUM, R.S. Proteolysis of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 in the Male Reproductive Tract. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 2, p. 618-624, 1996.

RAJ, H.G.M.; DYM, M. The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 489-494, 1976.

RICKES, E.L.; CHANG, C.H.; LARSEN, J.G.; TRIMBOLI, W.A.; SEWARD, R.L.; TAYLOR, J.E.; CHEN, H.Y.; HICKEY, G.J. Effects of GHRP-6 or porcine somatotropin (PST) on plasma GH, IGF-1, BUN, insulin and glucose in swine during repeated administration over 72 hours. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 313, 1991. Supplement.

ROSENBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 283-285, 1983.

ROSER, J.F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 139-151, 2001.

RUCKEBUSCH, Y.; PHANEUF, L.P.; DUNLOP, R. **Physiology of Small and Large Animals**. Philadelphia: B.C. Decker, 1991.

SANTOS, R.L.; SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.F.; VASCONCELOS, A.C.; PESQUERO, J.L.; COELHO, S.G.; SERAKIDES, R.; REIS, S.R. Effect of growth hormone and

induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. **Theriogenology**, v. 51, n. 5, p. 975-984, 1999.

SAUERWEIN, H.; BREIER, B.H.; GALLAHER, B.W.; GÖTZ, C.; KÜFNER, G.; MONTAG, T. VICKERS, M.; SHCALLENBERGER, E. Growth hormone treatment of breeding bulls used for artificial insemination improves fertilization rates. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, p. 145-158, 2000.

SCHAMS, D.; BERISHA, D.; KOSMANN, M.; EINSPANIER, R.; ANSELGRUBER, W.M. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 279-285, 1999.

SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in Mammals: germ cells and fertilization**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 63-101.

SETCHELL, B.P. Male Reproductive Organs and Semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**, 4. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 221-249⁴.

SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SHABANOWITZ, R.B.; KILLIAN, G.J. Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins in Principal Cells, Spermatozoa, and Fluid Associated with the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 753-768, 1987.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.) **The Physiology of Reproduction**, 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 1363-1434.

SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, K.; FISHER, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003.

SILVA, R.G. e CASAGRANDE, J.F. Influence of high environmental temperatures on some characteristics of Zebu bull semen. In: **VIIIth International Congress on**

³ JONES, R.C.; CLULOW, J. In: Proceedings of the 1st Asian & Oceanian Physiological Society, Bangkok, Thailand: The physiological Society, p. 229-240, 1987.

Animal Reproduction and Artificial Insemination. Anais. Cracow, p. 939-942, 1976.

SKINNER, J.D. e LOUW, G.N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 6, p. 1784-1790, 1966.

SPRANDO, R.L.; SANTULLI, R.; AWONIYI, C.A.; EWING, L.L.; ZIRKIN, B.R. Does ethane 1,2-dimethanesulphonate (EDS) have a direct cytotoxic effect on the seminiferous epithelium of the rat testis? **Journal of Andrology**, v. 11, p. 344-352, 1990.

STABENFELDT, G.H. O sistema endócrino. In: CUNNINGHAM, J.G. (Ed.) **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 259-271.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E. Processos Reprodutivos no Macho In: SWANSON, J.M.; REECE, W.O. (Ed.). **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 603-614.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Versão 5., Cary: SAS Institute, 1995.

SWANLUND, D.J.; N'DIAYE, M.R.; LOSETH, K.J.; PRYOR, J.L.; CRABO, B.G. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 4, p. 749-757, 1995.

THATCHER, C.L.; THOMPSON JUNIOR, D.L.. Effects of frequency of treatment recombinant equine somatotropin on selected biological responses in geldings. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, p. 127-143, 2002).

THOMAS, M.G.; ENNS, R.M.; HALLFORD, D.M.; KEISLER, D.H.; OBEIDAT, B.S.; MORRISON, C.D.; HERNANDEZ, J.A.; BRYANT, W.D.; FLORES, R.; LOPEZ, R.; NARRO, L. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance-tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 757-767, 2002.

TRENKLE, A., WILLHAM, R.L. Beef production efficiency. **Science**, v. 198, p. 1009-1011, 1977.

VALE FILHO, V.R.; MEGALE, F.; GARCIA, J.O.; ABREU, J.J.; FONSECA, V.O.; RESENDE, J. Prevalências das causas de baixa fertilidade e infertilidade em touros criados em diferentes regiões do Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 14, p. 179, 1974. Anais.

VALE FILHO, V.R.; PINTO, P.A.; FONSECA, J.; SOARES, L.C.O.V. **Patologia do sêmen: Diagnóstico andrológico e classificação de *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil – de um estudo de 1088 touros**. São Paulo : Dow Química, 1979. 54p.

VANELLI, B.G.; BARNI, T.; ORLANDO, C.; NATALI, A.; SERIO, M.; BALDONI, G.C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. **Fertility and Sterility**, v. 49, p. 666-669, 1988.

VOGLER, C.J. SAACKE, R.G.; BAME, J.H.; DEJARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, M.L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3827-3835, 1991.

VOGLER, C.J.; BAME, J.H.; DEJARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, M.L.; SAACKE, R.G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207-1219, 1993.

WASSERMAN, R.H.; KALLFELZ, F.A.; LUST, G. Ossos, articulações e líquido sinovial. In: SWANSON, J.M.; REECE, W.O. (Ed.). **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, p.507, 1996. 856p.

WENKOFF, M.S. **The Evaluation of Bulls for Breeding Soundness**. 2. ed. Ottawa: Canadian Veterinary Medical Association, 1988.

WISE, T.; KLINDT, J.; LUNSTRA, D.D.; BUONOMO, F.C.; YEN, J.T. Thymic, gonadal, and endocrine relationships in gilts and boars administered porcine somatotropin. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2992-3000. 1996.

WITE, I.G. Secreções do Trato Reprodutivo Masculino e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. p. 212-228.

YUN-TIAN SUN; WREFORD, N.G.; ROBERTSON, D.M.; KRETZER, D.M. Quantitative cytological studies of spermatogenesis in intact and hypophysectomized

rats: identification of androgen-dependent stages. **Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 1215-1223, 1990.

ZIRKIN, B.R.; SANTULLI, R.; AWONIYI, C.A.; EWING, L.L. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinology**, v. 124, p. 3043-3049, 1989.

ANEXO A - DOSE DE bST (mg) UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

TOURO	GRUPO	Semana				
		8	10	12	14	16
A120	BST	854,4	874,2	878,4	844,8	812,4
A137	BST	781,2	781,2	782,4	784,8	795,6
A151	IST	741,6	740,4	759,6	758,4	720,0
A159	IST	811,2	811,8	831,6	814,8	855,0
B3	IST	744,6	769,2	780,0	765,6	790,8
B5	BST	735,0	757,8	769,2	777,6	765,6
B18	BST	686,4	691,2	667,2	673,2	694,8
B91	IST	768,6	781,8	791,4	768,0	772,8

BST = grupo sem insulação testicular e tratado com somatotropina;

IST = grupo com insulação testicular e tratado com somatotropina.

ANEXO B – PROTOCOLOS DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Temperatura = 10 °C

Centrifugação em 2 etapas:

- 1) 500 g / 15 minutos no tubo de colheita;
- 2) retirada do sobrenadante;
- 3) transferência para novo tubo;
- 4) 6.000 g durante 15 minutos;
- 5) retirada do sobrenadante;
- 6) transferência para tubos criogênicos;
- 7) armazenamento (-20 °C).

ANEXO C – Curva de validação do kit ACTIVE™ DLS 4000 RIA para Testosterona. Pirassununga, 2004

Regression Summary

curva adapt vs. curva kit

Count	4
Num. Missing	0
R	,992
R Squared	,995
Adjusted R Squared	,977
RMS Residual	3,385

ANOVA Table

curva adapt vs. curva kit

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Regression	1	1461,970	1461,970	127,621	,0077
Residual	2	22,911	11,456		
Total	3	1484,881			

Regression Coefficients

curva adapt vs. curva kit

	Coefficient	Std. Error	Std. Coeff.	t-Value	P-Value
Intercept	-5,470	6,378	-5,470	-,858	,4814
curva kit	1,073	,095	,992	11,297	,0077

**ANEXO D – Curva de validação do kit IRMA ACIVE™ DLS 5600 para IGF1.
Pirassununga, 2004**

Regression Summary
curva adapt vs. curva kit

Count	4
Num. Missing	0
R	,998
R Squared	,995
Adjusted R Squared	,993
RMS Residual	1,468

ANOVA Table

curva adapt vs. curva kit

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Regression	1	898,995	898,995	418,965	,0024
Residual	2	4,312	2,156		
Total	3	903,307			

Regression Coefficients
curva adapt vs. curva kit

	Coefficient	Std. Error	Std. Coeff.	t-Value	P-Value
Intercept	3,045	2,021	3,045	1,507	,2708
curva kit	,701	,034	,998	20,420	,0024

As informações de temperatura (°C) foram obtidos na estação meteorológica da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), pertencente à Universidade de São Paulo.

As temperaturas foram registradas diariamente, com intervalos de dez minutos e são apresentadas a seguir. Para apresentação dos dados, foi calculada a média diária para temperaturas (°C) máxima, mínima e média. A primeira colheita foi realizada no dia 05 de dezembro de 2003 e a última no dia 16 de abril de 2004 (semana 01 e semana 20, respectivamente).

ANEXO E – Temperaturas (°C) máxima, média e mínima entre 28 de Novembro de 2003 e 16 de Abril de 2004 – Pirassununga