ALEXANDRE ROSSETTO GARCIA

Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)

Pirassununga-SP
2004

ALEXANDRE ROSSETTO GARCIA

Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)

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-SP
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. 1432
FMVZ

Garcia, Alexandre Rossetto

Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*) / Alexandre Rossetto Garcia. – São Paulo : A. R. Garcia, 2004.
258 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. Sêmen animal. 2. Estresse térmico. 3. Degeneração testicular.
4. Somatotropina bovina (bST). 5. Cromatina. 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 referendun".

(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 referendun", meeting.

São Paulo, 17 de dezembro de 2003

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do Autor: GARCIA, Alexandre Rossetto

Título: Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*).

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: _____

*A meus pais, José Garcia Martins e
Doralice Rossetto Garcia, pelas lições
transmitidas durante esses trinta anos de
amor...*

*Às queridas irmãs Daniela e Ana Paula,
pelos gostosos momentos desde a
infância...*

*A Michelle, por compartilharmos amor,
sonhos, alegrias e algumas
dificuldades....*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Aos avós Antônio e Leonor Garcia, Francisco (*in memorian*) e Rosa Rossetto, por serem a raiz desta grande e frondosa árvore.

Por conseguinte, a todos os Rossetto e todos os Garcia (que não são poucos!), tias, tios, primas e primos, pela preocupação e estímulo para continuar a caminhada.

Em especial à Tia Ica, pela ajuda com moldes, pela destreza e paciência na confecção das bolsas insuladoras e à Tia Lu e Tio Alicio, pelas boas conversas.

A Jefferson e Anna Maria, Marcos e Maria Clara, Dona Emi, Junior, Emi, Yuri e Ygor, pelo convívio e acolhidas na simpática Londrina.

Ao professor e grande amigo Rubens Arruda, que enfrentou o desafio de me acolher na Ciência, por ser um mestre no sentido estrito e maior da palavra. E a toda sua família (Dana, Grazi, Rubinho, Lalá e Bibi), por me receberem sempre como sendo de casa.

Aos colegas de pós-graduação Eneiva Carla Celeghini, André Furugen, Cláudia Raphael, Juliana Nascimento e Luiz Waldemar Souza, pelo trabalho conjunto e bons momentos no LBSA.

Ao Professor Paulo Mazza Rodrigues, pelo auxílio com análises e discussões estatísticas.

Ao Professor Félix Ribeiro de Lima, pela ajuda com documentos.

Aos Professores Antônio Emídio Feliciano, Marina Unanian, Mário Binelli, Ed Madureira, Lia Coelho, João Negrão, Flávio Meirelles e Aneliese Traldi pelas valorosas sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Professores Wilson Matos e Dayse Shimizu, reitores do CESUMAR e da UNITERRA, pelo apoio à realização deste trabalho.

A todos os funcionários do VRA: Bel, Márcio, Zé Maria, Cleuza, Quel e à Giovana (LMMD), pelas ajudas sempre tão bem-vindas.

*“Eu te louvarei, porque de um modo tão admirável e maravilhoso fui formado;
maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem.”*

Salmo 139

RESUMO

GARCIA, A.R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. [Effects of thermal stress and recombinant bovine somatotropine employment on seminal features, integrity of membranes, mitochondrial function and chromatin structure of spermatozoa from Simmental bulls (*Bos taurus taurus*)]. 2004. 258f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

Uma abordagem mais moderna sobre o binômio estresse térmico-degeneração foi realizada, visando monitorar a integridade de acrossomo, mitocôndrias e cromatina. Raros são os trabalhos sobre os efeitos da somatotropina bovina exógena (bST) sobre a qualidade seminal de touros que tenham passado por períodos de estresse térmico e conseqüente degeneração testicular. Foram objetivos do trabalho: 1) Comparar as características seminais e espermáticas de touros normais e touros submetidos a estresse térmico testicular (tratados ou não com bST); 2) Avaliar a integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial e defeitos cromossômicos de espermatozóides de touros normais e touros submetidos a estresse térmico testicular (tratados ou não com bST). Para tanto, o experimento foi dividido em 4 fases: Fase Pré-Insulação: período do dia 1 ao dia 35 (dia 1 = dia do início do experimento), Fase Pré-Tratamento: período do dia 36 ao dia 63 (colocação da bolsa insuladora no dia 36 por 96 horas), Fase Tratamento: período do dia 64 ao dia 119 (aplicações de bST), Fase Pós-tratamento: período do dia 120 ao dia 154. O sêmen de dezesseis touros Simental (*Bos taurus taurus*) foi coletado semanalmente ao longo de 22 semanas (154 dias). Os touros foram divididos em quatro grupos: o Grupo CONT foi o controle, não foi submetido a qualquer tratamento; o Grupo INSUL sofreu insulação testicular; o Grupo bST recebeu aplicações de somatotropina

bovina (Lactotropin®, 1 mg/kg PV) a cada quatorze dias a partir do dia 64; o Grupo lbST sofreu insulação e recebeu aplicações de somatotropina. Os animais foram avaliados quanto às características físicas e seminais. O estresse térmico testicular influenciou negativamente o perímetro escrotal, a motilidade espermática, o vigor, o movimento de massa, mas aumentou o total de defeitos espermáticos. A somatotropina bovina influenciou a quantidade de cabeças piriformes nos ejaculados. Os defeitos de cromatina foram influenciados pelo estresse térmico testicular. A população de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e potencial mitocondrial foi reduzida em função do estresse térmico testicular.

Palavras-chave: Sêmen Animal. Estresse térmico. Degeneração testicular. Somatotropina bovina (bST). Cromatina.

ABSTRACT

GARCIA, A.R.. **Effects of thermal stress and recombinant bovine somatotropine employment on seminal features, integrity of membranes, mitochondrial function and chromatin structure of spermatozoa from Simmental bulls (*Bos taurus taurus*)**. [Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)]. 2004. 258f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

Modern approach concerning binomial thermal stress-testicular degeneration was done in order to study chromatin, acrosomal and mitochondrial integrity. Furthermore, there are few relates about effects of exogenous bovine somatotropine (bST) on seminal quality of bulls which were submitted to thermal stress and consequent testicular degeneration. The objectives of this study were: 1) Comparing seminal and spermatogenic features of bulls which were submitted to testicular thermal stress (treated or not with bST); 2) Evaluating of the plasmatic and acrosomal membrane integrity, mitochondrial function, and chromosomal defects from the spermatozoa of these bulls. The experiment was divided in 4 phases. Pre-insulation phase: from day 1 to 35 (day 1 = first day of experiment), Pre-treatment phase: from day 36 to 63, Treatment phase: from day 64 to 119 (treatment with bST) and Post-treatment phase: from day 120 to 154. Semen of sixteen Simmental bulls (*Bos taurus taurus*) was collected once a week, during 22 weeks (154 days). Bulls were split in four groups: Group CONT was the control, and it was not treated or insulated; Group INSUL was insulated; Group bST was treated with bovine somatotropine (Lactotropin®, 1.2 mg/kg BW) each 14 days since day 64. Group IbST was insulated and treated with bST. Physical and seminal features of bulls were evaluated. Thermal stress decreased scrotal circumference, sperm motility, vigour and gross motility, and

increased total sperm defects. The bST increased pyriform heads in ejaculated. Testicular thermal stress increased chromatin defects. Sperm population with intact plasmatic membranes, intact acrosome and mitochondrial function were reduced by testicular thermal stress.

Key words: Animal Semen. Thermal stress. Testicular degeneration. Bovine somatotropine (bST). Chromatin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia do lote de touros utilizados demonstrando a homogeneidade dos animais quanto ao padrão racial, ao tamanho e à idade (A) e de touro individualizado (B).....	88
Figura 2 -	Resumo ilustrativo do período experimental e dos procedimentos experimentais adotados. Pirassununga, 2004.....	95
Figura 3 -	Fotografias de modelo de bolsa insuladora confeccionada mostrando a camada interna antiabrasiva e a camada externa impermeável (A), e o sistema de fechamento com tira plástica e velcro largo (B e C)	97
Figura 4 -	Fotografias mostrando a colocação da bolsa insuladora em touro (A), com detalhe para a coaptação na região do funículo espermático (B) e ajuste ao animal (C).....	98
Figura 5 -	Fotografias demonstrando procedimentos de mensuração da temperatura da superfície escrotal (A) e de avaliação da consistência testicular (B).....	101
Figura 6 -	Fotografias de equipamento (A) e procedimento (B) utilizados para colheita de sêmen por eletroejaculação	102
Figura 7 -	Fotografias do microscópio de contraste de fase utilizado para as análises de motilidade, vigor e turbilhonamento (A) e do microscópio de epifluorescência utilizado para análises de integridade de membranas, acrossomo, função mitocondrial e integridade de cromatina (B).....	107
Figura 8 -	Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MIAI-CP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial (A) e MIAI-SP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial (B).....	194

Figura 9 -	Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MIAL-CP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial (A) e MIAL-SP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial (B).....	194
Figura 10 -	Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MLAI-CP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial (A) e MLAI-SP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial (B).....	195
Figura 11 -	Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MLAL-CP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial (A) e MLAL-SP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial (B).....	195
Figura 12 -	Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias quanto à fragmentação do DNA: espermatozóide com cromatina íntegra (A) e espermatozóide com cromatina fragmentada (B).....	212

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características reprodutivas avaliadas e padrões mínimos considerados para a inserção dos touros no experimento – LBSA-FMVZ-USP, Pirassununga - 2004	90
Quadro 2 -	Grupos de tratamentos experimentais e procedimentos realizados em cada tratamento – LBSA-FMVZ-USP, Pirassununga - 2004.....	92
Quadro 3 -	Classificação dos espermatozóides em categorias quanto à integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e função mitocondrial, e padrão de coloração à microscopia de epifluorescência – LBSA-FMVZ-USP, Pirassununga - 2004	108

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Temperaturas ambientais máxima, média e mínima (°C) durante o período de 14/11/2003 a 16/04/2004 - Pirassununga-SP, 2004	113
Gráfico 2 -	Umidade relativa do ar (%) durante o período de 14/11/2003 a 16/04/2004 - Pirassununga-SP, 2004.....	114
Gráfico 3 -	Perímetro escrotal médio de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	123
Gráfico 4 -	Motilidade espermática média de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	132
Gráfico 5 -	Vigor espermático médio de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	134
Gráfico 6 -	Turbilhonamento médio do sêmen de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	136
Gráfico 7 -	Ocorrência de defeitos de acrossomo em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	140
Gráfico 8 -	Ocorrência de gota protoplasmática proximal em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	143
Gráfico 9 -	Ocorrência de cauda enrolada na cabeça em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	146

Gráfico 10 -	Ocorrência de cabeças isoladas patológicas em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	149
Gráfico 11 -	Ocorrência de cabeças piriformes em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	155
Gráfico 12 -	Ocorrência de cabeças pequenas anormais em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	158
Gráfico 13 -	Ocorrência de contorno anormal de cabeça em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	161
Gráfico 14 -	Ocorrência de <i>pouch formation</i> em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	164
Gráfico 15 -	Ocorrência de cauda fortemente dobrada em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	168
Gráfico 16 -	Ocorrência de cauda dobrada com gota em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	171
Gráfico 17 -	Ocorrência de cabeças isoladas normais em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	175

Gráfico 18 -	Ocorrência de implantações abaxiais, retroaxiais ou oblíquas em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	177
Gráfico 19 -	Total de defeitos maiores em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	184
Gráfico 20 -	Total de defeitos menores em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	188
Gráfico 21 -	Total de defeitos espermáticos em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	192
Gráfico 22 -	Ocorrência de espermatozóides com membrana citoplasmática lesada em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	199
Gráfico 23 -	Ocorrência de espermatozóides com acrossomo lesado em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	203
Gráfico 24 -	Ocorrência de espermatozóides sem potencial mitocondrial em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	207
Gráfico 25 -	Ocorrência de espermatozóides com membrana citoplasmática íntegra, com acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (MIAI-CP) em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	211

Gráfico 26 -	Ocorrência de espermatozóides com fragmentação de DNA em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004	216
---------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos touros segundo nota obtida em índice preestabelecido e distribuição dos animais em blocos e grupos experimentais. Pirassununga, 2004.....	91
Tabela 2 -	Análise de variância para delineamento com 4 tratamentos, 16 animais e 22 diferentes tempos de amostragem. Pirassununga, 2004	110
Tabela 3 -	Temperatura retal média em °C ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	117
Tabela 4 -	Temperatura escrotal média em °C ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	118
Tabela 5 -	Consistência testicular média em escala de 1 a 5 ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	121
Tabela 6 -	Perímetro escrotal médio em centímetros ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	122
Tabela 7 -	Concentração espermática média em milhões de espermatozoides/mL ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	126
Tabela 8 -	Valor do pH médio ($\pm$ EPM) do sêmen de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	128

Tabela 9 -	Motilidade espermática média em porcentagem ($\pm$ EPM) do sêmen de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	131
Tabela 10 -	Vigor espermático em escala de 0 a 5 ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	133
Tabela 11 -	Turbilhonamento médio em escala de 0 a 5 ($\pm$ EPM) do sêmen de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	135
Tabela 12 -	Ocorrência média de defeitos de acrossomo em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	139
Tabela 13 -	Ocorrência média de gota protoplasmática proximal em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	142
Tabela 14 -	Ocorrência média de cauda enrolada na cabeça em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	145
Tabela 15 -	Ocorrência média de cabeças isoladas patológicas em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	148

Tabela 16 -	Ocorrência média de cabeças estreitas na base em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	153
Tabela 17 -	Ocorrência média de cabeças piriformes em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	154
Tabela 18 -	Ocorrência média de cabeças pequenas anormais em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	157
Tabela 19 -	Ocorrência média de contorno anormal de cabeça em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	160
Tabela 20 -	Ocorrência média de <i>pouch formation</i> em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	163
Tabela 21 -	Ocorrência média de patologias de peça intermediária (fibrilação, fratura total ou parcial, edema, pseudogotas) em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	165
Tabela 22 -	Ocorrência média de cauda fortemente dobrada em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	167

Tabela 23 -	Ocorrência média de cauda dobrada com gota em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	170
Tabela 24 -	Ocorrência de cabeças isoladas normais em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	174
Tabela 25 -	Ocorrência de implantações abaxiais, retroaxiais ou oblíquas em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	176
Tabela 26 -	Ocorrência de cauda dobrada ou enrolada em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	179
Tabela 27 -	Ocorrência de gota protoplasmática distal em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	180
Tabela 28 -	Total de defeitos maiores em porcentagem ($\pm$ EPM) em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	183
Tabela 29 -	Total de defeitos menores em porcentagem ($\pm$ EPM) em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	187

Tabela 30 -	Total de defeitos espermáticos em porcentagem ($\pm$ EPM) em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	191
Tabela 31 -	Ocorrência de espermatozóides com membrana citoplasmática lesada em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	198
Tabela 32 -	Ocorrência de espermatozóides com acrossomo lesado em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004.....	202
Tabela 33 -	Ocorrência de espermatozóides sem potencial mitocondrial em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	206
Tabela 34 -	Ocorrência de espermatozóides com membrana citoplasmática íntegra, com acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (MIAI-CP) em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	210
Tabela 35 -	Ocorrência de espermatozóides com fragmentação de DNA em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004	215

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	proteína ligadora de andrógenos
AO	acridina laranja
AZF	<i>azoospermic factor</i> (fator de azoospermia)
bST	grupo somatotropina
bST	somatotropina bovina
CBRA	Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal
CONT	grupo controle
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPBS	solução tampão fosfatada de Dulbecco
dw/dw	linhagem de ratos anões
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	corante conjugado de isotiocianato de fluoresceína e <i>Pisum sativum</i> aglutinina
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSH	hormônio folículo estimulante
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GH	hormônio do crescimento
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
IbST	grupo insulado / somatotropina
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina – Tipo 1

IGFBP-3	proteína ligante à IGF
IM	inverso da motilidade
INSUL	grupo insulado
LBSA	Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia
LH	hormônio luteinizante
MAI-CP	espermatozóide com membrana plasmática íntegra, com acrossomo intacto e com potencial mitocondrial
MAI-SP	espermatozóide com membrana plasmática íntegra, com acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial
MIAL-CP	espermatozóide com membrana plasmática íntegra, com acrossomo lesado e com potencial mitocondrial
MIAL-SP	espermatozóide com membrana plasmática íntegra, com acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial
MITO	corante fluorescente Mito Tracker Green FM
MLAI-CP	espermatozóide com membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com potencial mitocondrial
MLAI-SP	espermatozóide com membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial
MLAL-CP	espermatozóide com membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com potencial mitocondrial
MLAL-SP	espermatozóide com membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial
MMR	mismatch repair (reparo de erros)
pH	concentração de íons de Hidrogênio
PI	corante fluorescente iodeto de propídio

PI/PSA	corantes fluorescentes iodeto de propídio + <i>Pisum sativum</i> aglutinina
PNA	corante fluorescente <i>Peanut</i> aglutinina
PSA	corante fluorescente <i>Pisum sativum</i> aglutinina
PV	peso vivo
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
ROS	espécies de oxigênio reativo
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
SCSA	teste de estrutura da cromatina espermática
sptz	espermatozóides
T3	hormônio triiodotironina
TDMA	Total de defeitos maiores
TDME	Total de defeitos menores
TGF	fator transformador de crescimento
USP	Universidade de São Paulo
var	variedade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
-	menos
>	maior
±	mais ou menos
®	marca registrada
<	menor
$\propto 1$	alfa um: relação entre o número de células com fluorescência em vermelho e o número total de células com fluorescência (técnica de acridina laranja)
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
'	minuto
''	segundo
+	mais
=	igual
10^6	milhões
cm	centímetros
g	grama
h	hora
Kg	quilograma
log	logaritmo

m	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
nm	nanômetros
°	grau
°C	graus Celsius
P	nível de significância
r	coeficiente de correlação
R ²	coeficiente de determinação
X	versus
x	vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	OBJETIVOS	36
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	39
3.1	A FORMAÇÃO E A LIBERAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES	40
3.2	AS CÉLULAS “AUXILIARES” DA ESPERMATOGÊNESE	43
3.3	CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN BOVINO	48
3.4	FATORES ENDÓCRINOS, PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS DA REPRODUÇÃO MASCULINA	50
3.5	INFORMAÇÕES SOBRE O CONTROLE GENÉTICO DA GAMETOGÊNESE MASCULINA	53
3.6	A IMPORTÂNCIA DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NORMAL.....	56
3.7	DEGENERAÇÃO TESTICULAR E MECANISMOS DE TERMORREGULAÇÃO ESCROTAL E TESTICULAR EM BOVINOS.....	60
3.8	ESTUDOS SOBRE O ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR EM BOVINOS	63
3.9	EFEITOS DA INSULAÇÃO TESTICULAR NA ESPERMATOGÊNESE	69
3.10	A SOMATOTROPINA E AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS MASCULINAS	74
3.11	AS SONDAS FLUORESCENTES NO MONITORAMENTO DE MEMBRANAS E CROMATINA DOS ESPERMATOZÓIDES	78

4	MATERIAL E MÉTODO	86
4.1	LOCAL E PERÍODO	87
4.2	ANIMAIS E MANEJO ZOOTÉCNICO.....	88
4.3	POTENCIAL FERTILIDADE DOS ANIMAIS E CRITÉRIO DE DISTRIBUIÇÃO NOS TRATAMENTOS.....	89
4.4	TRATAMENTOS.....	92
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	93
4.6	INDUÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR	96
4.7	TRATAMENTO COM SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (BST).....	99
4.8	MONITORAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTAL E UMIDADE DO AR.....	99
4.9	MENSURAÇÃO DAS TEMPERATURAS RETAL E DA SUPERFÍCIE ESCROTAL	100
4.10	MENSURAÇÃO DO PERÍMETRO ESCROTAL E DA CONSISTÊNCIA TESTICULAR.....	101
4.11	COLHEITA DO SÊMEN	102
4.12	DETERMINAÇÃO DE VOLUME, CONCENTRAÇÃO E PH SEMINAL	103
4.13	DETERMINAÇÃO DE MOVIMENTO DE MASSA, MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICOS.....	103
4.14	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	105
4.15	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	106
4.16	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA	109
4.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	109

5	RESULTADOS	111
5.1	DADOS CLIMÁTICOS	113
5.2	TEMPERATURA RETAL E TEMPERATURA DA SUPERFÍCIE ESCROTAL	115
5.3	CONSISTÊNCIA TESTICULAR E PERÍMETRO ESCROTAL	119
5.4	VOLUME, CONCENTRAÇÃO E PH SEMINAL.....	124
5.5	MOTILIDADE, VIGOR ESPERMÁTICO E MOVIMENTO DE MASSA.....	128
5.6	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	137
5.7	INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	193
5.8	INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA.....	212
6	DISCUSSÃO	217
6.1	DADOS CLIMÁTICOS	218
6.2	TEMPERATURA RETAL E TEMPERATURA DA SUPERFÍCIE ESCROTAL	219
6.3	CONSISTÊNCIA TESTICULAR E PERÍMETRO ESCROTAL	220
6.4	VOLUME, CONCENTRAÇÃO E PH SEMINAL.....	222
6.5	MOTILIDADE, VIGOR ESPERMÁTICO E MOVIMENTO DE MASSA.....	225
6.6	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	228
6.7	INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	231
6.8	INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA.....	235
7	CONCLUSÕES	238
	REFERÊNCIAS	241
	ANEXOS.....	253

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Apesar das dificuldades econômicas ocorridas na última década, o Brasil apresentou uma significativa evolução de seu Produto Interno Bruto, o qual saltou de 993 bilhões para 1.321 bilhões de reais no período de 1992 a 2002. Parte deste incremento produtivo deve-se à participação expressiva da atividade agropecuária. Dados atuais revelam que no ano de 2002, o setor agropecuário contribuiu com 8,2% de toda produção interna brasileira¹, gerando um crédito aproximado de 117 bilhões de reais.

Dentre as emergentes cadeias produtivas nacionais, merece destaque a cadeia da carne bovina. Além de atender o mercado interno brasileiro, que conta com aproximadamente 174 milhões de habitantes, o Brasil consolidou-se em 2003 como o maior exportador de carne bovina do mundo. Mantido o ritmo atual, até o final de 2004 o país venderá ao exterior mais de 1,5 milhão de toneladas em equivalente-carcaça, posicionando-se à frente de nosso maior concorrente em exportações de carne bovina, a Austrália.

Enquanto o rebanho bovino mundial vem crescendo de forma relativamente lenta, a uma razão média de 0,9% ao ano entre 1961 e 2002, o Brasil experimenta um rápido crescimento de seu contingente, posicionado-se como detentor do segundo maior rebanho bovino (possui 13% da população mundial de bovinos) e do maior rebanho comercial do mundo.

Entretanto, os índices produtivos e reprodutivos ainda carecem de certa melhora. A taxa de abate anual brasileira é da ordem de 23% e a taxa de fertilidade média do rebanho não ultrapassa os 62% (MARQUES, 2003). Apesar de várias

biotecnologias da reprodução animal serem bem dominadas e poderem contribuir para uma elevação dos índices reprodutivos, certos pontos críticos constituem entraves para o aumento da média da produção nacional.

A inseminação artificial, por exemplo, é usada atualmente em apenas 5 a 7% das 73,5 milhões de matrizes em idade reprodutiva do rebanho brasileiro². Isto significa que no Brasil aproximadamente 69 milhões de fêmeas ainda são acasaladas todos os anos por touros em regime de monta natural. Desta forma, os touros que servem a campo são responsáveis por elevada parcela de contribuição na disseminação do material genético no rebanho nacional.

Como consequência dos sistemas de criação estabelecidos no Brasil, os grandes rebanhos bovinos estão localizados nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e mais recentemente Norte, onde os animais recebem com máxima intensidade os efeitos diretos e indiretos do clima.

Apesar de haver predominância populacional de animais zebuínos na pecuária de corte nacional, com o estímulo ao uso do cruzamento industrial na última década, a participação numérica de touros de raças taurinas que servem a campo aumentou consideravelmente e este fator não pode ser desprezado. Essa opção de cruzamento propiciou a progressão do número de touros taurinos jovens adquiridos e usados na produção de carne.

Muitas vezes, os machos de raças de origem européia são criados em condições ideais e, ao atingirem a maturidade sexual, são introduzidos em ambientes adversos e submetidos a condições de elevadas temperaturas. Todavia, sabe-se que para as condições de clima tropical, machos taurinos freqüentemente entram em estresse térmico, o que afeta negativamente seu comportamento

¹ FONTE: Anuário Estatístico - Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior (2003)

² FONTES: Associação Brasileira de Inseminação Artificial (2003) e Anuário Anualpec (2004).

reprodutivo, diminui sua eficiência reprodutiva, podendo levar à infertilidade do macho, com significativo impacto na fertilidade dos rebanhos. Via de regra, estes problemas reprodutivos nos machos estão associados a um quadro patológico conhecido como “degeneração testicular”.

Segundo trabalhos de Vale Filho e colaboradores (1981), a degeneração testicular é a mais importante causa de subfertilidade e infertilidade em touros que servem a campo no Brasil Central, a qual está diretamente relacionada ao estresse térmico sofrido pelos animais. De fato, o estresse térmico prejudica não somente a normalidade da função testicular, mas também afeta negativamente a capacidade fecundante dos espermatozóides produzidos e põe em risco o desenvolvimento de embriões gerados a partir de gametas anormais.

Apesar de seus efeitos negativos sobre a espermatogênese e sobre a morfologia espermática serem bem conhecidos, o binômio estresse térmico-degeneração testicular tem sido estudado desde a década de 40 sob a óptica de técnicas clássicas de avaliação andrológica. A modernização de equipamentos e de novas técnicas de análise gerou a necessidade de uma abordagem mais moderna do assunto. Desta feita, ainda se conhece muito pouco sobre, por exemplo, os efeitos do estresse térmico e da elevação da temperatura testicular sobre algumas estruturas do espermatozóide, cuja integridade e funcionalidade são cruciais para o desenvolvimento normal da fecundação.

Paralelamente, a somatotropina tem sido usada com sucesso para o incremento do quadro seminal em homens com histórico de insucesso reprodutivo, ocasionando aumento da motilidade espermática em indivíduos astenozoospermicos após aplicação exógena. Certo efeito positivo do uso da somatotropina já foi observado também em bovinos. Esta informação reveste-se de maior importância

especialmente quando touros de excepcional mérito genético mantidos a campo ou em centrais de inseminação artificial são afetados e demonstram decréscimo na qualidade seminal, justificando os estudos sobre métodos terapêuticos nos casos em que a subfertilidade ou infertilidade do macho foi adquirida. Considerando isso, é interessante a proteção da saúde desses touros melhoradores.

Contudo, raros são os trabalhos sobre os efeitos biológicos da somatotropina exógena sobre a qualidade seminal em animais de produção, especialmente aqueles que tenham passado por períodos de estresse térmico e que culminaram em um quadro de degeneração testicular.

Desta forma, ao aliar técnicas clássicas de avaliação seminal a recentes métodos de avaliação espermática e ao uso da somatotropina, o presente estudo pretende ampliar o conhecimento sobre as consequências do estresse térmico testicular em touros e testar uma possibilidade de procedimento terapêutico que poderia ser útil na tentativa de restabelecer o desempenho reprodutivo de animais de reconhecido mérito genético e que apresentem diminuição da fertilidade, desde que esta se caracterize como um problema adquirido.

Objetivos

2 OBJETIVOS

A hipótese principal foi que o estresse térmico testicular tem influência negativa sobre os parâmetros seminais, as características morfológicas espermáticas e as características morfofuncionais associadas aos espermatozóides de touros (integridade de membranas, função mitocondrial e integridade da cromatina) monitoradas por microscopia de epifluorescência. A hipótese secundária levantada foi que a somatotropina recombinante bovina, administrada em 5 aplicações subcutâneas com intervalos de 14 dias, têm influência positiva sobre os parâmetros seminais, a morfologia espermática, a integridade de membranas, a função mitocondrial e a integridade da cromatina de touros submetidos ou não a estresse térmico testicular.

O objetivo geral foi estudar as consequências do estresse térmico testicular sobre a espermatogênese de touros taurinos criados a campo e a possibilidade do tratamento desse estresse através do uso da somatotropina recombinante bovina (bST), com acompanhamento por técnicas clássicas de análise seminal associadas ao uso de fluorocromos em microscopia de epifluorescência.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

1) Avaliar ao longo de 22 semanas as características de temperatura retal, temperatura da superfície escrotal, perímetro escrotal e consistência testicular de touros submetidos ou não a estresse térmico testicular, tratados ou não com bST.

2) Avaliar os efeitos do estresse térmico testicular e da aplicação de bST sobre a concentração espermática e o pH do sêmen de touros ao longo de 22 semanas.

3) Avaliar os efeitos do estresse térmico testicular e da aplicação de bST sobre as características de movimento de massa, motilidade espermática e vigor espermático de touros ao longo de 22 semanas.

4) Avaliar ao longo de 22 semanas, através do uso de microscopia de contraste de fase, os efeitos do estresse térmico testicular e da aplicação de bST sobre a morfologia espermática de touros.

5) Avaliar ao longo de 22 semanas, através do uso de microscopia de epifluorescência, os efeitos do estresse térmico testicular e da aplicação de bST sobre a integridade de membrana plasmática, a integridade de acrossomo e a função mitocondrial, e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros.

6) Comparar ao longo de 22 semanas as populações de espermatozóides potencialmente capazes de realizar a fecundação, provenientes de touros submetidos ou não ao estresse térmico testicular, tratados ou não com bST.

7) Avaliar ao longo de 22 semanas a integridade de estrutura da cromatina pela detecção de fragmentação do DNA em espermatozóides de touros submetidos ou não a estresse térmico testicular, tratados ou não com bST.

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A FORMAÇÃO E A LIBERAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES

A formação dos espermatozóides é chamada de “espermatogênese”. Citologicamente, a espermatogênese pode ser caracterizada como um processo complexo de transformação de uma célula germinativa pouco diferenciada, a espermatogônia, em uma célula altamente especializada, o espermatozóide, cuja estrutura é direcionada a um só objetivo: a fertilização do ovócito (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003).

A espermatogênese é, portanto, o conjunto de divisões e modificações celulares que resultam na formação de espermatozóides a partir de espermatogônias (ORTAVANT; COUROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS, 1977). Constitui uma seqüência de divisões celulares sucessivas que ocorrem no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e que transformam uma célula germinativa diplóide em um gameta masculino. Cada estágio do desenvolvimento pode ser observado no epitélio espermatogênico, de modo que as células menos diferenciadas estão localizadas na periferia dos túbulos, enquanto as células mais maduras posicionam-se próximas à luz tubular (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003).

Devido a seu caráter cíclico, os vários tipos celulares presentes no interior de uma secção perpendicular do epitélio seminífero formam associações celulares bem definidas. Doze associações ou estágios celulares distintos são identificáveis no

epitélio seminífero do touro. Um ciclo completo de estágios, conhecido como “ciclo do epitélio seminífero” é dependente do tempo e pode ser definido como “uma série de modificações entre duas aparições de associação celular ou de estágios de desenvolvimento em determinada área do epitélio seminífero”. A duração de um ciclo do epitélio seminífero no touro é de 14 dias. Quatro a cinco ciclos epiteliais são necessários para que uma célula-tronco do primeiro ciclo (espermatogônia Tipo A) complete a metamorfose da espermiogênese (GARNER; HAFEZ, 2004).

Segundo Johnston, Kustritz e Olson (2001), a espermatogênese compreende duas fases distintas: a espermatocitogênese (fase de formação das espermatídes a partir de espermatogônias) e a espermiogênese (fase de diferenciação de espermatídes em espermatozóides). A espermatogênese é um evento que se inicia com a entrada do macho na puberdade e continua constantemente, independente da frequência de ejaculação, findando com a chegada da senescência reprodutiva.

No epitélio germinativo dos túbulos seminíferos existem duas populações de espermatogônias, que são células germinativas pouco diferenciadas: as espermatogônias Tipo A e as espermatogônias Tipo B. A população de espermatogônias Tipo A constitui uma população de reserva, cujas células são extremamente resistentes à radiação e injúrias tóxicas. A população de espermatogônias Tipo B é uma população proliferativa, cujas células são capazes de se dividir para formar os espermatócitos primários (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

A espermatocitogênese envolve a divisão mitótica de espermatogônias A1 em células mais diferenciadas, denominadas espermatogônias A2, A3, Intermediárias, B1 e B2. Estas últimas se dividem para originar dois espermatócitos primários, que entram em meiose para formar os espermatócitos secundários e eventualmente

espermátides (AMAN; SCHANBACHER, 1983). Do ponto de vista de variabilidade genética, a fase inicial da meiose (chamada de prófase) é crucial, pois é durante a mesma que ocorre a recombinação gênica. Todo o processo de espermatocitogênese divisional, desde espermatogônia até espermátide, leva aproximadamente 45 dias no touro (GARNER; HAFEZ, 2004).

Na espermiogênese, as espermátides se diferenciam para originar os espermatozóides (AMAN; SCHANBACHER, 1983). As espermátides já são células haplóides; neste estágio de desenvolvimento não ocorre mais nenhuma divisão celular e cada espermátide inicia sua transformação em um espermatozóide. Durante esta transformação, o núcleo das espermátides passa por uma condensação gradual da cromatina (JOHANISSON et al., 2000), o que confere forma alongada ao seu citoplasma e núcleo. As espermátides adquirem um acrossomo sobreposto à cabeça, um flagelo bem desenvolvido, uma peça intermediária ricamente circundada por mitocôndrias e eliminam uma gota de citoplasma excedente (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

Os espermatozóides formados pela diferenciação das espermátides ainda não possuem poder de fecundação. São liberados gradativamente dos túbulos seminíferos para túbulos estreitos, alcançam a *rete testis* e chegam ao epidídimo, onde adquirem motilidade própria e capacidade fecundante como parte de seu processo de maturação. Durante a espermatogênese, a degeneração aleatória de uma célula em particular pode acontecer a qualquer momento, sem comprometer as outras células que permanecem em divisão ou em transformação. Estudos mostram que cerca de 25% das células germinativas normalmente se degeneram durante o transcorrer da espermatogênese (GREEP, 1976).

Os espermatozóides maduros são transportados e armazenados na cauda do epidídimo e, embora o ambiente epididimário seja favorável a sua sobrevivência, estes não são preservados indefinidamente. No touro, o tempo despendido para o transporte dos espermatozóides pelo epidídimo é de cerca de sete dias. Contudo, este transporte depende de contrações que ocorrem na parede do ducto deferente, três vezes por minuto. Importante notar que o tempo de trânsito pode ser reduzido de 10 a 20%, pelo aumento da frequência da ejaculação (GARNER; HAFEZ, 2004).

No momento da cópula, a estimulação de nervos sensoriais localizados na glândula peniana desencadeia uma série de contrações peristálticas nas paredes musculares do epidídimo e há a liberação dos espermatozóides armazenados, que se misturam instantaneamente aos fluidos produzidos pelo trato reprodutivo masculino e são ejaculados (STABENFELDT; EDQVIST, 1988). Os espermatozóides não ejaculados são gradualmente eliminados por excreção na urina ou sofrem gradual senescência e se desintegram (GARNER; HAFEZ, 2004).

3.2 AS CÉLULAS “AUXILIARES” DA ESPERMATOGÊNESE

Além das células germinativas, os testículos contêm células somáticas que suportam a espermatogênese, cada qual com funções bem definidas: são as células de Sertoli e as células de Leydig. As células de Sertoli revestem internamente os túbulos seminíferos (MOORE; PERSAUD, 2000) e delimitam dois compartimentos: o compartimento basal, onde se localizam as espermatogônias, e o espaço adluminal, onde estão as células mais desenvolvidas da espermatogênese (JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 1999). Já as células de Leydig estão localizadas no espaço extratubular (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003), preenchendo o espaço entre os túbulos seminíferos, onde também se encontram nervos, vasos sangüíneos, vasos linfáticos e uma população celular variável que inclui fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SETCHELL, 1991).

Durante a embriogênese, as células de Sertoli são as primeiras células a se diferenciarem para a formação da gônada fetal masculina. Sua diferenciação permite a formação do cordão sexual masculino, estrutura primordial do testículo, e a secreção do hormônio anti-mülleriano, que garante a regressão dos ductos müllerianos, estruturas primordiais do sistema reprodutivo feminino (MACKAY, 2000).

Nos touros, o período neonatal e o período pré-pubere são marcados pela proliferação das células de Sertoli, que deixa de ocorrer no animal adulto. Fatores genéticos, hormonais e fatores de crescimento parecem estar envolvidos na proliferação e funcionalidade dessas células (SHARPE et al., 2003).

À puberdade, as células de Sertoli sofrem uma mudança na sua morfologia e função. Sob ação do hormônio folículo estimulante (FSH), dos andrógenos e dos hormônios tireoidianos, em especial o T3, as células de Sertoli passam de um estado imaturo para um estado maduro, não-proliferativo (SHARPE et al., 2003). Assim, estas passam a suportar a espermatogênese, controlando a nutrição dos espermatozóides em formação, fagocitando restos citoplasmáticos que se desprendem das espermátides e secretando fluido de transporte espermático. É provável que a complexa mudança dos espermatócitos para espermátide e finalmente para espermatozóides livres na luz do túbulo seminífero não ocorreria sem a comunicação célula-célula entre as células de Sertoli (JOHANISSON et al.,

2000). Sem esse suporte físico e metabólico provido pelas células de Sertoli, a diferenciação das células germinativas, sua meiose e a transformação em espermatozóides não ocorrem (SHARPE, 1994).

Outro papel importante desempenhado pelas células de Sertoli é a formação da barreira hematotesticular, uma barreira seletiva constituída por junções oclusivas entre as células de Sertoli adjacentes, cuja função é proteger as células espermatozoides mais desenvolvidas de moléculas estranhas trazidas pelo sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Devido a esses fatores, existe uma alta correlação entre o número total de células de Sertoli presentes nos testículos adultos e a população de células germinativas que pode ser suportada por elas (ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988). Conseqüentemente, o número de células de Sertoli influencia a produção diária de espermatozóides, com um reflexo óbvio sobre a fertilidade (SHARPE et al., 2003). Alguns problemas qualitativos que afetam a fertilidade masculina parecem também ocorrer quando interações deficientes entre as células de Sertoli se fazem presentes, levando à liberação prematura de células espermatozoides imaturas, com alta propensão a disfunções celulares induzidas por radicais livres (HUSZAR; VIGUE, 1994).

Já as células de Leydig constituem o tipo celular predominante no espaço extratubular, sendo responsáveis pela produção de esteróides, como a testosterona e a diidrotestosterona, andrógenos de importante ação sobre o sistema genital. Podem ocupar desde uma pequena porcentagem até 60% do compartimento entre os túbulos seminíferos, dependendo da espécie (FRANÇA et al., 1998). No touro, as células de Leydig compõem 3,9% da população celular testicular total (SILVA JÚNIOR; FRANÇA, 2001).

Histologicamente, as células de Leydig podem ser identificadas pela sua posição e forma, pois se localizam entre os túbulos seminíferos e são relativamente grandes, poliédricas, de aspecto epitelióide e limitadas por típica membrana plasmática que contém microvilos. Cada célula possui núcleo esférico ou ovóide, excentricamente posicionado e com um a três nucléolos. Seu citoplasma é abundante e contém grande quantidade de retículo endoplasmático liso, mitocôndrias com cristas tubulares e Complexo de Golgi bem desenvolvido (SETCHELL, 1991).

A função esteroidogênica da célula de Leydig apresenta relação direta com o volume ocupado pelo retículo endoplasmático liso em seu interior e com o número de células de Leydig presentes por testículo. O touro possui aproximadamente 20 milhões de células de Leydig por grama de tecido testicular, número próximo ao do rato (22 milhões) e do garanhão (24 milhões), mas inferior ao do carneiro (38 milhões) e do cachaço (107 milhões) (SILVA JÚNIOR; FRANÇA, 2001).

A célula de Leydig é especializada na síntese de testosterona, sendo esta estimulada principalmente pelo LH. Sob estímulo adequado, as células de Leydig obtêm o colesterol pela captura de lipoproteínas da circulação através de receptores específicos. Segundo Silva Júnior e França (2001), no interior da célula de Leydig o colesterol é transportado para junto das membranas mitocondriais e, ao ser translocado para a membrana mitocondrial interna pela enzima StAR, sofre a clivagem de sua cadeia lateral pela enzima citocromo P450_{scc}, e se transforma em pregnenolona. A partir daí, a esteroidogênese pode seguir duas vias distintas: a via dos cetoesteróides, conhecida como via Δ^4 (pregnenolona $\Rightarrow$ progesterona $\Rightarrow$ androstenediona $\Rightarrow$ testosterona) ou a via dos hidroxisteróides, conhecida como via

Δ^5 (pregnenolona $\Rightarrow$ 17 α -hidroxipregnenolona $\Rightarrow$ deidroepiandrostenediona $\Rightarrow$ androstenediona $\Rightarrow$ testosterona).

Como não há provisão para o armazenamento dos hormônios sexuais no interior das células após sua formação, a testosterona é secretada por difusão através da estrutura lipofílica da membrana celular (GRECO; STABENFELDT, 1999). A proteína ligadora de andrógenos (proteína ABP) é conhecida pela sua habilidade em transportar andrógenos, de modo que uma de suas funções é carrear a testosterona para diferentes tecidos-alvo do sistema reprodutivo, assumindo importante papel para o transcurso normal do processo da espermatogênese (ROSER, 2001).

A testosterona produzida pelas células de Leydig é fundamental para o desenvolvimento completo das espermatídes e para a adesão destas às células de Sertoli. Na presença de testosterona a etapa final de formação das espermatídes ocorre normalmente. Contudo, em situações em que as concentrações de testosterona são baixas, a eficiência desse processo cai para 15% dos níveis normais. A testosterona possui efeitos também sobre o citoesqueleto das células de Sertoli, o que permite a adesão entre estas células e as espermatídes em início de alongamento. Na ausência de testosterona, a adesão entre células de Sertoli e espermatídes é desfeita, impedindo a maturação das espermatídes (MCLACHLAN et al., 1996).

3.3 CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN BOVINO

Denominamos “sêmen” à suspensão celular líquida contendo os espermatozóides e as secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão é conhecida como plasma seminal. Os espermatozóides são células flageladas que têm como seus principais componentes químicos os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos, além de serem ricos em fósforo, nitrogênio e enxofre. Já a porção fluida seminal apresenta quantidades apreciáveis de ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos e numerosas enzimas, além de imunoglobulinas da classe A e uma variedade de substâncias hormonais, como andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante (LH), hormônio do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina e encefalinas (GARNER; HAFEZ, 2004).

Em média, o ejaculado de um touro adulto normal apresenta de 5 a 8 mL, com concentração espermática que varia entre 800 milhões a 2 bilhões de células por mL. Estão presentes em um ejaculado de 5 a 15 bilhões de espermatozóides, sendo que, via de regra, 65 a 95% deles são morfologicamente normais. Para bovinos, o pH seminal normal se situa entre 6,4 a 7,8 e os componentes químicos seminais usuais são: proteínas (6,8g/100mL), frutose (460 a 600mg/100mL), sorbitol (10 a 140mg/100mL), ácido cítrico (620 a 806mg/100mL), inositol (25 a 46mg/100mL), glicerilfosforilcolina (100 a 500mg/100mL), sódio (225 ± 13 mg/100mL), potássio (155 ± 6 mg/100mL), cálcio (40 ± 2 mg/100mL), magnésio ($8 \pm 0,3$ mg/100mL) e cloreto (174 a 320 mg/100mL) (GARNER; HAFEZ, 2004).

Durante as análises de sêmen podem ser encontradas ainda no ejaculado células que não possuem características típicas de espermatozóides. Podem ser células inflamatórias, espermátides degeneradas, células originadas do epitélio prostático, células originadas do epitélio das vesículas seminais ou células de descamação (JOHANISSON et al., 2000).

A complexa migração que envolve as células germinativas da camada basal para a luz do epitélio seminífero freqüentemente ocasiona a liberação de algumas células imaturas no ejaculado. Entretanto, em casos de danos aos túbulos seminíferos, as conexões que estruturam ordenadamente o epitélio são desfeitas, resultando na liberação prematura de um número excessivo de células germinativas imaturas (JOHANISSON et al., 2000), principalmente espermatócitos e espermátides (GABALDI, 1999).

Vários autores estão convencidos de que a presença de células inflamatórias no sêmen interfere com a capacidade fecundante dos espermatozóides (AITKEN; BAKER, 1995; WOLFF, 1995), principalmente devido ao estresse oxidativo.

A susceptibilidade do espermatozóide ao ataque de radicais livres que desestabilizam a membrana plasmática acentua a preocupação com a geração de espécies de oxigênio reativo (ROS), uma vez que já foi demonstrado que a competência do espermatozóide para se fundir com a membrana vitelina do ovócito é inversamente proporcional à geração de espécies de oxigênio reativo. A geração de radicais livres afeta não somente a fluidez e a integridade da membrana plasmática, mas também atinge o DNA no núcleo espermático. A fragmentação do DNA é comumente observada nos espermatozóides de indivíduos inférteis e há fortes evidências que estes danos sejam mediados pela ação dos radicais livres e induzidos por estresse oxidativo (SUN, JURISICOVA; CASPER, 1997).

Populações de espermatozóides defeituosos isolados de indivíduos com oligozoospermia, astenozoospermia e varicocele demonstram possuir alta geração de ROS. Já foi demonstrado também que esse estresse oxidativo se origina de duas fontes celulares distintas: os próprios espermatozóides e os leucócitos presentes no ejaculado (AITKEN, 1999).

3.4 FATORES ENDÓCRINOS, PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS DA REPRODUÇÃO MASCULINA

Sabe-se bem que em muitas espécies de mamíferos, inclusive no touro, a espermatogênese é um evento dependente do funcionamento de um eixo endócrino conhecido como “eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular”, o qual envolve ações clássicas das gonadotrofinas, mecanismos de retroalimentação (*feedback*) de esteróides e proteínas, além de mecanismos de modulação parácrina e autócrina.

O controle endócrino principal deste eixo está baseado em dinâmicas mudanças nos padrões de secreção do hormônio hipotalâmico (o hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH), dos hormônios hipofisários (hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante – FSH e LH, respectivamente), dos hormônios testiculares (como os andrógenos) e da inibina. Quando as gonadotrofinas são suprimidas em um animal adulto a produção espermática é abolida (MCLACHLAN et al., 1996). Porém, outros hormônios produzidos periféricamente como a prolactina, o hormônio do crescimento (GH) e a insulina apresentam efeitos sobre diferentes tipos celulares e também parecem exercer efeitos sobre os testículos (MATSUMOTO, 1989).

Em adição ao controle endócrino da função testicular, existe um sistema complementar de mecanismos autócrinos e parácrinos, cujo papel é coordenar várias funções de diferentes células testiculares em nível local. São apontados como elementos reguladores parácrinos e autócrinos de importância fisiológica para a espermatogênese substâncias como a testosterona, a inibina, o estrógeno, as ativinas, os peptídeos análogos do GnRH, os fatores de crescimento, a ocitocina, a vasopressina, a transferrina, a interleucina-1, a substância modificadora peritubular, a proteína ligadora de andrógenos e os opióides (HUHTANIEMI; TOPPARI, 1995).

De forma resumida, pode-se apresentar o funcionamento principal do “eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular” do seguinte modo: quando estimulado, o hipotálamo libera o hormônio GnRH segundo um padrão pulsátil. Por sua vez, o GnRH liberado estimula a produção e secreção episódica das gonadotrofinas hipofisárias: o FSH e o LH. O FSH se liga às células de Sertoli para a liberação de inibina, ativina, ABP e outros fatores necessários à espermatogênese, além de exercer uma ação sinérgica à testosterona para manter quantitativamente a normalidade da espermatogênese. Já o LH tem a função de estimular as células de Leydig a produzirem testosterona, a qual é essencial para a manutenção e a restauração da espermatogênese em animais adultos (MATSUMOTO, 1989). Os hormônios esteróides e proteínas produzidos nos testículos modulam as descargas de GnRH, FSH e LH via um mecanismo de retroalimentação de alça longa, de modo que a testosterona liberada inibe as descargas pulsáteis de GnRH pelo hipotálamo e a inibina atua sobre a hipófise, minimizando a liberação do FSH.

Já os mecanismos autócrinos e parácrinos de controle da espermatogênese apoiam-se em um sensível sistema de comunicação local entre a camada basal dos túbulos seminíferos, o compartimento adluminal e a região intersticial aos túbulos

seminíferos. Por definição, fatores parácrinos são aquelas substâncias produzidas por um tipo celular e que atuam em outro tipo celular presente no mesmo órgão. Já fatores autócrinos são substâncias que têm como local de produção e local de ação um mesmo tipo celular (HEINDEL; TREINEM, 1989). Assim, delicadas interações entre as células de Leydig, as células de Sertoli, as células mióides peritubulares e as células da linhagem germinativa influenciam as ações do sistema endócrino, afetando em última instância as funções testiculares de produção de andrógenos e de espermatogênese.

Segundo Roser (2001), dentre vários fatores autócrinos/parácrinos produzidos no sistema reprodutivo masculino, alguns podem ser destacados:

- Inibina: é um membro da família dos fatores transformadores de crescimento (TGF- β), secretada pelas células de Sertoli. É capaz de reduzir o número de espermatogônias nos testículos de animais adultos.
- IGF-1: também é um fator de crescimento produzido nas células de Sertoli. É capaz de estimular a proliferação das células de Sertoli em animais pré-púberes, a síntese de DNA nas espermatogônias e aumentar a atividade do RNAm nas células de Leydig, culminando com maior produção de testosterona.
- Proteínas ABP: são produzidas nas células de Sertoli. Têm reconhecida habilidade para se ligar e transportar andrógenos para o interior do túbulo seminífero e outros locais do trato reprodutivo masculino, como as células epididimárias. Por isso, quando ligadas a andrógenos, influenciam diretamente a espermatogênese.
- Interleucinas: são citocinas produzidas nas células de Sertoli, importantes para a regulação da divisão, proliferação e diferenciação das células germinativas.

- Vasopressina: fator produzido pelas células de Leydig. Atua como fator autócrino, causando inibição da produção de testosterona.
- Ocitocina: também é um fator produzido pelas células de Leydig. Atua como fator autócrino ao estimular a produção de testosterona e como fator parácrino ao aumentar a contratilidade das células do túbulo seminífero para propelir os espermatozóides rumo à *rete testis*.

Assim, as evidências mais recentes demonstram que a normalidade da espermatogênese é dependente não somente do eixo hipotálamo-hipofisário-testicular, mas também de mecanismos parácrinos e autócrinos que modulam a atividade celular testicular, influenciando desta forma a esteroidogênese e os processos de divisão e multiplicação celular.

3.5 INFORMAÇÕES SOBRE O CONTROLE GENÉTICO DA GAMETOGENESE MASCULINA

O desenvolvimento dos testículos e o curso normal da espermatogênese requerem a interação de um grande número de fatores, alguns deles dependentes de transcrição genética, síntese de hormônios e atividade de seus receptores. Estudos mais recentes realizados principalmente em camundongos e humanos têm abordado o processo da espermatogênese não somente de forma descritiva, mas também considerado a importância de genes controladores desse processo nos mamíferos. Conseqüentemente, alguns genes têm sido identificados como importantes controladores do processo da espermatogênese.

O gene SRY está localizado no cromossomo Y e regula, de acordo com o conceito corrente, a determinação do sexo nos mamíferos. É, portanto, apontado como o principal gene de controle da espermatogênese. Ele regula a ativação dos genes na cascata de eventos que determinam o sexo, apesar de seu alvos diretos não serem completamente conhecidos. O gene SRY inicia o desenvolvimento dos testículos no período embrionário a partir de células bipotentes da gônada primitiva, levando ao desenvolvimento das células de Sertoli e das células de Leydig e culminando com o desenvolvimento do fenótipo masculino, que depende da presença e ação dos andrógenos. Os mecanismos da organogênese testicular disparados pelo gene SRY ativam a sinalização celular e controlam a reorganização, proliferação e migração celular, além da formação do sistema tubular dos testículos (KOOPMAN, 1999).

Nos animais adultos, genes localizados no cromossomo Y e conhecidos como AZFa, AZFb e AZFc são genes do fator de azoospermia (AZF, da expressão em inglês *azoospermic factor*). Os genes AZF comprovadamente controlam parte do processo da espermatogênese, pois indivíduos com deleção do *locus* AZF apresentam espermatogênese afetada devido a um bloqueio na formação das espermatogônias (ELLIOT; COOKE, 1997). Já a deleção específica do gene AZFb induz a inativação funcional dos genes da família RBM, os quais codificam proteínas envolvidas no metabolismo de RNAs essenciais para a espermatogênese (KENAN; QUERY; KEENE, 1991).

Em murinos, o braço curto do cromossomo Y contém o gene *Spy*, um gene de ação significativa para o processo de proliferação de espermatogônias. Animais portadores de mutação ou deleção do gene *Spy* apresentam bloqueio da

espermatogênese na fase de espermatogônia (MITCHELL; AGULNIK; BISHOP, 1994).

Ao considerar a importância dos genes autossômicos para a espermatogênese, deve-se salientar a função dos genes SPO11 e dos genes do sistema MMR (genes de *mismatch repair*). O primeiro é responsável pelo processo de iniciação da recombinação na meiose, enquanto os genes do sistema MMR são ativados automaticamente quando há necessidade de reparos de erros no DNA, que podem ser causados por falhas durante o processo de replicação ou de recombinação genética. Quando transcritos, os genes do sistema MMR corrigem inserções ou deleções defectivas de nucleotídeos no DNA (ROMANIENKO; CAMERINI, 2000).

Estudos sobre o cromossomo autossômico 17 tornaram possível mapear vários *loci* relacionados com certas anormalidades de sêmen. O locus stop1 deste cromossomo está relacionado a defeitos na função espermática e afeta significativamente a capacidade do espermatozóide em penetrar no oolema. Isso ocorre devido a dois elementos: a parte proximal de um dos cromossomos se sobrepõe ao locus Hst6 e é responsável por defeitos morfofuncionais no flagelo dos espermatozóides, enquanto a outra se dispõe mais distalmente ao Hst6. A expressão fenotípica do Hst6 é, então, dada por um defeito que causa curvatura específica do flagelo do espermatozóide (REDKAR et al., 1998).

Uma outra mutação, a do gene Hst7, afeta a motilidade dos espermatozóides devido à apresentação de vários defeitos na cauda, incluindo anormalidade de elementos do axonema, alinhamento irregular das mitocôndrias e fissuras na região média da membrana mitocondrial (PILDER, HAMMER; SILVER, 1997). Estudos posteriores sobre causas genéticas de distúrbios da motilidade identificaram uma

família de vários genes, na qual se incluem os genes Tctex1 e Tctex2. Esses genes codificam proteínas necessárias para a formação do axonema de espermatozóides de todas as espécies mamíferas. O gene Tctex2 é ainda responsável pelas reações que garantem os movimentos heliciformes dos flagelos e, de forma correspondente, pelos movimentos progressivos dos espermatozóides (INABA; KAGAMI; OGAWA, 1999).

Outro gene de importância quanto à morfologia espermática é o gene Smy, o qual é apontado como um dos responsáveis pelo controle do desenvolvimento morfológico normal da cabeça do espermatozóide (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003). Porém, a despeito das falhas originadas por fatores genéticos e hereditários, o funcionamento do epitélio seminífero pode, como todo atributo fenotípico, ser influenciado por fatores ambientais.

3.6 A IMPORTÂNCIA DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NORMAL

A morfologia dos espermatozóides tem sido aceita como um dos componentes importantes para a fertilidade dos machos bovinos. Após a cópula, o trato reprodutivo feminino impõe barreiras anatômicas naturais como a cérvice, o corpo do útero e os cornos uterinos, limitando o acesso de grande parte dos espermatozóides anormais à junção ampola-istmo, onde ocorre a fertilização. As camadas celulares que revestem o ovócito também podem exercer alguma seleção sobre os espermatozóides, tornando espermatozóides com defeitos morfológicos menos eficientes na penetração e ligação à zona pelúcida (JOHNSON, 1997).

Como a espermatogênese é um evento extremamente delicado, qualquer fator capaz de alterar esse processo resulta na produção de espermatozóides anormais. Dentre as alterações morfológicas mais comuns, segundo Barth e Oko (1989), podem ser citadas:

- Cabeças Piriformes: é um dos mais comuns defeitos de cabeça. A forma da cabeça é derivada primariamente da forma do núcleo. As células com cabeças piriformes têm a região acrossomal normal e a região pós-acrossomal mais afilada. Esse defeito pode ter como causa fatores genéticos ou ambientais e se relaciona com a fertilidade. A possibilidade de retorno à produção de células normais por um animal que produz altas porcentagens de cabeças piriformes no sêmen depende da causa do problema.
- Knobbed Acrossomo: é identificado pela observação de achatamento ou de irregularidades na curvatura normal do ápice do acrossomo, resultado de um excesso de matriz acrossomal e dobramento da crista apical. É um defeito originado durante a espermatogênese. A vesícula formada pode conter fragmentos aderidos de membranas das células de Sertoli ou do Complexo de Golgi, ou pode ser simplesmente uma dobra da membrana acrossomal externa sobre si mesma. Sua origem pode ser genética ou ambiental. Espermatozóides com *knobbed* acrossomo são comumente encontrados no sêmen de touros com distúrbio de espermatogênese e causam drástica redução na fertilidade.
- Vacúolos Nucleares: são defeitos visualizados freqüentemente no ápice do núcleo como orifícios únicos ou múltiplos, ou identificados como vários pequenos vacúolos alinhados na região equatorial do espermatozóide, chamados de “diadema”. Os vacúolos podem variar de tamanho, número e posição no núcleo, podendo aparecer conjugados a outros defeitos em um mesmo espermatozóide.

São originados pela invaginação da membrana nuclear para o núcleo durante estágios iniciais da espermatogênese. Os espermatozóides acometidos por vacúolos nucleares apresentam drástica redução de fertilidade.

- Cabeças Isoladas: uma pequena porcentagem de cabeças isoladas é encontrada no sêmen de touros normais. Altas porcentagens têm sido associadas com hipoplasia testicular, degeneração testicular e inflamação de glândulas acessórias. É um defeito originado na fossa de implantação, local onde a cauda se acopla à cabeça. A fragilidade de ligação cabeça-cauda determina ruptura da estrutura assim que a célula inicia sua movimentação. A fertilidade é extremamente afetada em animais com alta porcentagem de cabeças isoladas.
- Cabeças Pequena e Cabeças Gigantes: anomalias também conhecidas como microcefalia e macrocefalia, respectivamente. O tamanho anormal das cabeças espermáticas pode ser originado pelo número cromossômico anormal, resultado de distribuição desigual dos cromossomos durante a divisão meiótica dos espermatócitos.
- Cauda Dobrada: é a anomalia mais comum que acomete a cauda dos espermatozóides. Este defeito compreende uma série de variações, com dobramentos que vão de 90 a 180 graus, de modo que no último caso a peça principal se situa adjacente à cabeça, levando as células a ter movimento circular ou retrógrado. Esse defeito é originado na fase de maturação espermática no corpo e cauda do epidídimo. Uma gota citoplasmática que normalmente é liberada durante o trânsito do espermatozóide pelo epidídimo pode ser patologicamente retida pela dobra da cauda. Como resultado da motilidade espermática anormal, provavelmente o espermatozóide não entrará em contato com a zona pelúcida e não fertilizará o ovócito.

- Implantação Abaxial: ocorre quando a cauda é implantada descentralizada em relação à base da cabeça espermática. Tem pouco efeito negativo sobre a fertilidade.
- Gotas Protoplasmáticas: podem ser observadas como gotas proximais (localizadas na peça intermediária, próximas à cabeça) ou gotas distais (localizadas no final da peça intermediária, próximo ao *anulus*). Durante a espermatogênese, a maioria das gotas é removida pelas células de Sertoli e na espermição uma pequena quantidade de gotas permanece na peça intermediária. Durante a maturação no epidídimo as gotas protoplasmáticas que permaneceram se movem da posição proximal para a distal e são liberadas da peça intermediária antes da ejaculação. A retenção das gotas na posição proximal indica espermatogênese anormal, enquanto a retenção na posição distal é associada com maturação anormal. Alta incidência de gotas proximais é observada em touros jovens e imaturos e declina com a maturidade sexual. Alta incidência de gotas proximais em touros maduros pode indicar problema na espermatogênese. Gotas são observadas no ejaculado 9 dias após a o estabelecimento de estresse térmico induzido por insulação testicular.
- Aplasia Segmentar da Bainha Mitocondrial: vários graus de aplasia da bainha mitocondrial podem ocorrer, mais freqüentemente próxima ao *anulus*. Fraturas de peça intermediária subsequentes a esse defeito são comuns.
- Espermatozóides Teratológicos: indicam aberrações severas na formação dos espermatozóides. Sua presença em grande quantidade é um indicativo de grave distúrbio na espermatogênese e um sinal de infertilidade.

3.7 DEGENERAÇÃO TESTICULAR E MECANISMOS DE TERMORREGULAÇÃO ESCROTAL E TESTICULAR EM BOVINOS

Nos bovinos, a temperatura interna corporal pode variar normalmente entre 36,7°C a 39,1°C, com média de 38,3°C (ANDERSON, 1988). Para os mamíferos que possuem testículos alojados em escrotos pendulares, inclusive touros, a espermatogênese normal é dependente da manutenção da temperatura testicular entre 2 e 6°C mais baixa que a temperatura corpórea. Sabe-se que existe um gradiente de temperatura no escroto e nos testículos, que aumenta quanto mais distante estiver a estrutura relativamente à cavidade abdominal. A temperatura média da superfície escrotal de touros é de 30,4°C (pólo dorsal), 29,8°C (região média) e 28,8°C (pólo ventral) (KASTELIC; COULTER; COOK, 1995).

É bem conhecido que um aumento da temperatura testicular diminui a qualidade do sêmen produzido (WAITES, 1970). Esse efeito negativo é resultante da degeneração testicular, uma patologia ocasionada, entre muitos fatores, por qualquer processo que determine a elevação da temperatura testicular, como por exemplo a dermatite escrotal, o excesso de gordura escrotal, edema, periorquite e elevação da temperatura ambiente com conseqüente estresse térmico (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Segundo Skinner e Louw (1966), a temperatura ambiente crítica para prejuízo da espermatogênese está entre 27°C e 32°C, e exposições contínuas a temperaturas excedendo 30°C podem determinar marcante efeito negativo sobre a produção espermática.

Clinicamente, a degeneração testicular leva inicialmente à flacidez e discreta diminuição do tamanho dos testículos, sendo que em etapas mais avançadas estes

podem tornar-se atrofiados, com tamanho reduzido, fibróticos e com consistência firme à palpação. Histologicamente, nota-se no túbulo seminífero diminuição da espermatogênese devido à morte das células da linhagem germinativa. As espermatogônias apresentam citoplasma vacuolizado e núcleo picnótico, as espermatídes se degeneram e há o aparecimento de células gigantes multinucleadas resultantes da fusão de várias espermatídes. Alguns túbulos podem mostrar ausência total do epitélio seminífero, membrana basal espessa e hialinizada e proliferação de tecido conjuntivo fibroso, que invade os túbulos em casos mais avançados (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; VAN CAMP, 1997).

O ejaculado de touros com degeneração testicular mediana apresenta baixa concentração espermática, baixa motilidade e número moderado de células com defeitos morfológicos, como gotas protoplasmáticas proximais, diadema, vacúolos e outros defeitos nucleares (WENKOFF, 1988). Em casos mais severos, além da oligozoospermia e da astenozoospermia, pode ser detectado também aumento no número de espermatozóides com anomalias morfológicas, especialmente com defeitos de peça intermediária e cabeça. A presença de células primordiais da linhagem espermatogênica, células gigantes, medusas ou células germinativas multinucleadas no ejaculado indica danos severos ao epitélio seminífero (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; VAN CAMP, 1997). A presença de espermatozóides com formas teratológicas em grande quantidade no ejaculado é um indicativo de espermatogênese severamente prejudicada (JOHNSON, 1997).

Apesar da termorregulação escrotal ser um fenômeno complexo que depende entre outros fatores da temperatura e umidade ambiental, da temperatura corporal, da postura do animal, da variação anatômica escrotal e da condição corporal do animal, o escroto tem alguns importantes mecanismos que facilitam sua

termorregulação. Sua posição pendular facilita a dissipação do calor e permite que os testículos sejam posicionados afastados da cavidade abdominal. A pele escrotal é fina, pouco pilosa, usualmente pobre em gordura subcutânea e possui um rico sistema de vasos sangüíneos e linfáticos, com diversas veias dispostas superficialmente, o que facilita a radiação do calor (KASTELIC, 1997). Ainda, a densidade de glândulas sudoríparas na pele escrotal dos touros é maior que em qualquer outra parte de seu corpo (BLAZQUEZ; MALLARD; WEDD, 1988).

O escroto possui ainda duas estruturas musculares que auxiliam na regulação da temperatura: a túnica dartos e o músculo cremaster. A túnica dartos é uma fina faixa de musculatura lisa sob a pele escrotal que possui inervação simpática e, portanto, movimentação involuntária. Ela contrai ou relaxa na dependência do ambiente estar frio ou quente, respectivamente. Já o músculo cremaster é um tecido muscular estriado que é contraído para aproximar os testículos da cavidade abdominal em situações de clima frio. Entretanto, ao contrário da túnica dartos, o cremaster não é capaz de manter a contração durante intervalos prolongados (SETCHELL, 1978).

O sistema vascular local compreende um conjunto de veias denominado “plexo pampiniforme” que aparece anatomicamente circundando a artéria testicular; a este grupo de estrutura denominamos “cone vascular”. O cone vascular tem como uma de suas funções promover a refrigeração do sangue arterial por mecanismo de contracorrente, determinando perda de calor do sangue arterial para o sangue venoso. O cone vascular parece ser um importante local de radiação de calor, pois a pele que recobre o cone é usualmente a área mais quente do escroto (LUNSTRA; COULTER, 1996).

Touros de qualidade seminal aceitável e atividade reprodutiva satisfatória podem diferir quanto à capacidade de termorregulação testicular. Machos que não mantêm um gradiente de temperatura no parênquima testicular exibem fertilidade reduzida em relação a touros de padrões de temperatura testicular normal ($P < 0,01$) quando usados para monta natural (83,4 versus 68,3%), segundo Lunstra e Coulter (1996).

Sabe-se ainda que touros que passaram por estresse térmico testicular com conseqüente quadro de degeneração testicular leve a moderada, mesmo após o retorno da espermatogênese à normalidade produziram espermatozóides com baixo potencial fertilizante e maior incidência de mortalidade embrionária (BURFENING; ULBERG, 1968).

3.8 ESTUDOS SOBRE O ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR EM BOVINOS

Os primeiros artigos científicos publicados sobre estresse térmico em touros tinham como objeto de estudo os machos de raças leiteiras datam do final da década de 1930 e meados da década de 1940. Visavam estudar a influência do ambiente sobre a fisiologia reprodutiva de touros criados confinados nas recém-criadas centrais de inseminação artificial. Remontam àquela época os trabalhos clássicos de Erb; Andrews e Hilton (1942); Lagerlof (1938); Mercier e Salisbury (1947); além de Swanson e Herman (1944).

Com o passar dos anos a população bovina para o corte ganhou espaço e importância econômica mundial. Modelos de produção fundamentados na criação

extensiva, com rebanhos de populações numerosas e acasalamentos baseados na monta natural obtiveram sucesso em países onde o custo da terra era baixo, muitos deles localizados na região intertropical. Esse fato gerou uma demanda por projetos que buscassem resolver problemas de subfertilidade e infertilidade de touros de corte, independentemente de seu genótipo. Neste contexto, foram publicados vários trabalhos, dentre os quais destacam-se os de Bonsma (1949) e Austin; Hupp e Murphree (1961).

Um dos primeiros trabalhos sobre estresse térmico em condições artificialmente controladas foi publicado por Casady; Myers e Legates (1952). Naquela oportunidade, quatro touros Guernsey foram mantidos durante semanas em câmara climatizada, sob temperaturas que variaram de 21,1 a 37,1°C e umidade relativa do ar entre 52 e 81%. Dada a severidade do protocolo testado, os animais manifestaram sintomatologia de estresse térmico (taquipnéia, queda no consumo de alimentos e água, ofegação constante) quando a temperatura dentro da câmara superava os 32,2°C. Curiosamente, apesar da diminuição da libido, os touros não falharam nas montas para coleta de sêmen. A motilidade espermática decresceu, chegando a ser nula para certos touros durante o teste. A concentração de espermatozóides ejaculados diminuiu devido à redução na espermatogênese, a qual pôde ser constatada histologicamente. Os animais mais jovens e aqueles criados confinados se mostraram mais sensíveis ao estresse térmico e, a partir deste experimento, os autores concluíram que a temperatura crítica para a espermatogênese em touros sob condição de exposição contínua ao calor estaria na faixa de 26,4 a 32,2°C.

Também usando câmara climatizada, Meyerhoeffer et al. (1985) avaliaram as características seminais e funções fisiológicas de touros de corte taurinos

submetidos a estresse térmico. Durante um período de oito semanas, os animais testados foram mantidos sob temperaturas diárias que variaram de 31 a 35°C. A indução do estresse térmico nos animais testados pôde ser confirmada pelo significativo aumento da frequência respiratória, temperatura retal e consumo de água. O número total de espermatozóides ejaculados não foi afetado pelo tratamento, porém tanto a motilidade quanto o vigor declinaram após quatro semanas do início do tratamento ($P < 0,05$). A motilidade espermática média dos touros testados declinou de 76% (pré-tratamento) para 48% após os touros serem estressados por oito semanas. A taxa de motilidade e o vigor dos touros tratados aumentaram gradualmente após o final do tratamento e oito semanas após o final do período de estresse não havia mais diferença entre os touros testados e os touros controle. O aumento na porcentagem de espermatozóides apresentando defeitos morfológicos nos touros testados foi detectado na terceira semana após o início do tratamento. A recuperação da morfologia espermática normal se iniciou três semanas após o final do estresse e em oito semanas a morfologia espermática retornou completamente aos valores diagnosticados no período pré-tratamento.

Apesar da possibilidade de uso de câmaras climatizadas, Parkinson (1987) preferiu testar o efeito da temperatura natural do ambiente sobre as características seminais. Ao trabalhar com dezessete touros holandeses ao longo de um ano e monitorar a temperatura ambiental, parâmetros seminais e endócrinos, este autor encontrou resultados com correlações interessantes. Constatou que quanto maior a temperatura máxima diária, menor seria a concentração de testosterona no plasma seminal. Como a espermatogênese é um evento dependente da liberação normal de testosterona, o número de espermatozóides com morfologia anormal de cabeça, cabeças isoladas, defeitos de peça intermediária, de cauda ou gotas citoplasmáticas

teve correlação alta e positiva com a temperatura máxima diária. Os defeitos espermáticos alcançaram valores percentuais maiores durante os meses de verão e houve uma tendência de melhora da qualidade seminal nos meses mais amenos do ano.

As variações sazonais na qualidade do sêmen de bovinos também foram relatadas por Kumi-Diaka; Nagaratnam e Rwuaan (1981). Baseados no conceito de “esterilidade de verão”, um fenômeno caracterizado pela queda transitória na fertilidade de animais criados nas regiões tropicais, esses autores testaram grupos de touros taurinos e de touros zebuínos submetidos à criação extensiva em região tropical durante doze meses consecutivos. As variações no espermiograma ao longo do tempo não foram significativas para os animais *Bos indicus* ($P > 0,05$), enquanto os animais *Bos taurus* mostraram significativa sazonalidade. Nestes últimos, a porcentagem de espermatozóides com cabeças gigantes, peças intermediárias com implantação abaxial, caudas enroladas, gotas citoplasmáticas proximais e gotas citoplasmáticas distais aumentaram significativamente na estação quente do ano ($P < 0,05$), com conseqüente redução da motilidade espermática. Os resultados obtidos apontaram não somente para os efeitos deletérios do calor ambiental sobre a qualidade do sêmen bovino, mas também fomentaram a discussão sobre as diferenças de sensibilidade ao estresse térmico determinadas pelas diferenças entre os genótipos dos indivíduos.

Levantamento realizado no Brasil por Ohashi e colaboradores (1988) sobre a incidência de distúrbios reprodutivos em 164 touros criados na região amazônica demonstrou diferenças entre touros zebuínos e taurinos. Quando criados em região de altas temperaturas médias e alta umidade, 15,8% de touros zebuínos apresentaram algum tipo de distúrbio reprodutivo, entre eles degeneração testicular

(4,2%), maturidade sexual retardada (3,2%) e fibrose do epidídimo (1,1%). Os touros taurinos apresentaram alta frequência de distúrbios reprodutivos com diagnóstico positivo em 75,9% dos casos, distribuídos em problemas de degeneração testicular (72,4%), e fibrose do epidídimo (3,4%). Nos caso em que a degeneração testicular foi detectada, o genótipo influenciou na severidade do quadro, com manifestação mais intensa de defeitos maiores nos touros taurinos (65,9 X 16,8%), entre eles anomalias de cabeça (38,6 X 8,8%), anomalias de acrossomo (12,4 X 0,0%) e *pouch formation* (7,8 X 0,0%). O processo degenerativo evoluiu, em 11 dos 21 touros taurinos afetados, para quadro de azoospermia e fibrose testicular.

Apesar de trabalhos apontarem para uma maior resistência dos animais zebuínos aos desafios ambientais de estresse térmico, os machos *Bos indicus* também sofrem, embora de forma mais amena que os *Bos taurus*. Em trabalho de Silva e Casagrande (1976), 130 touros zebuínos tiveram seus parâmetros espermáticos monitorados durante período do ano em que a temperatura média variou de 33,3 a 34,8°C. As altas temperaturas alcançadas 30 a 54 dias antes da coleta de sêmen afetaram negativamente a concentração espermática, além de afetar alguns padrões bioquímicos como o pH, que sofreu redução conforme a temperatura ambiental se elevou. Por isso, parece evidente que a qualidade seminal e, portanto, a utilidade dos touros zebuínos pode ser reduzida pela exposição direta dos mesmos a temperaturas acima de 30°C durante períodos de 36 a 54 dias antes das colheitas de sêmen.

Estudo de Brito et al. (2002) comparou os efeitos dos fatores ambientais e do genótipo na produção espermática de touros mantidos em centrais de inseminação artificial no Brasil durante dois anos consecutivos. A temperatura mensal média local aferida variou entre 22,6 e 23,4°C e a umidade média variou entre 68,7 e 71,4%

durante o período estudado. Foram constatados concentração espermática maior no sêmen produzido por touros zebuínos e número significativamente menor de espermatozóides defeituosos no sêmen de touros taurinos. Entretanto, neste estudo, a temperatura ambiente, a umidade e a variação das estações do ano não afetaram significativamente a produção espermática total e a qualidade do sêmen.

Mais recentemente, Pinho e colaboradores (2004) avaliaram a qualidade seminal e a circunferência escrotal de touros taurinos (raças Limousin, Simental e Charolês) e de touros zebuínos (raça Nelore) manejados extensivamente no Brasil em região de clima tropical. Foram testados 191 touros taurinos e 93 touros zebuínos cujo sêmen foi coletado por eletroejaculação. A circunferência escrotal média foi de $36,0 \pm 2,8$ cm (Limousin), de $39,3 \pm 4,0$ cm (Simental), de $36,0 \pm 3,3$ cm (Charolês) e de $34,7 \pm 2,7$ cm (Nelore). O volume dos ejaculados variou de 2 a 9 mL, com motilidade média de $58,7 \pm 19,6\%$, $60,4 \pm 19,7\%$, $67,1 \pm 18,6\%$ e $66,7 \pm 19,3\%$ para touros Limousin, Simental, Charolês e Nelore, respectivamente. Não foi constatada diferença significativa no vigor espermático entre as raças. A porcentagem de defeitos espermáticos totais foi de $31,4 \pm 18,5\%$, $33,6 \pm 17,3\%$, $31,1 \pm 16,2\%$ e $23,9 \pm 14,2\%$ nos touros Limousin, Simental, Charolês e Nelore, respectivamente, sendo que a média para os touros Nelore foi significativamente inferior às das outras raças ($P < 0,05$).

3.9 EFEITOS DA INSULAÇÃO TESTICULAR NA ESPERMATOGÊNESE

A insulação da região testicular é uma técnica de indução de estresse térmico localizado que eleva a temperatura dos testículos suficientemente para alterar a qualidade seminal, sem produzir maiores desequilíbrios sistêmicos nos animais (SETCHELL, 1998). Esta técnica consiste em isolar os testículos do animal em uma bolsa plástica isolante térmica, internamente forrada com lã (RAO, 1967), náilon (VOGLER; SAACKE; BAME 1993) ou tecido de algodão (JANUSKAUSKAS et al., 1995), cuja função é minimizar as trocas de calor entre os testículos e o meio ambiente.

Em protocolo experimental de insulação testicular, Rao (1967) detectou os primeiros sinais de anormalidade seminal aparecendo no ejaculado de touros entre 10 a 15 dias após a aplicação da bolsa insuladora. A motilidade média apresentou redução de 70 para 30% após a insulação, acompanhada de aumento nas anormalidades espermáticas, mormente de gotas protoplasmáticas proximais (de 20 para 50%) e anomalias de cabeça (de 5 para 62%).

Também em trabalho de insulação testicular em touros, Vogler; Saacke e Bame (1993) obtiveram temperatura média da superfície testicular de 34,8°C durante a manutenção da bolsa insuladora. Entre 15 a 18 dias após a insulação, a motilidade foi reduzida de 10 a 20% dos valores iniciais pré-insulação. A porcentagem de espermatozóides anormais foi elevada a partir do dia 12 pós-insulação, alcançando seu pico no dia 18. As anormalidades morfológicas apareceram no ejaculado seguindo uma ordem cronológica: cabeças isoladas apareceram em 12 a 15 dias pós-insulação (pico de $33,9 \pm 11,7\%$), seguidas por defeitos de diadema no dia 18

(pico de $55,6 \pm 10,5\%$), vacúolos nucleares e cabeças piriformes no dia 21 (pico de $24,8 \pm 5,8\%$ e $18,3 \pm 7,2\%$, respectivamente), *knobbed* acrossomo no dia 27 (pico de $11,8 \pm 5,5\%$) e Dag defeito no dia 30 (pico de $3,2 \pm 1,0\%$). O nível de espermatozóides anormais retornou aos níveis apresentados no período pré-estresse térmico em 39 dias após a insulação testicular.

Em trabalho de Gabaldi (1999) com animais da raça Nelore, 10 touros foram submetidos à insulação testicular por 96 horas e tiveram sêmen colhido durante 20 semanas consecutivas. O mesmo regime de colheitas foi executado para 10 touros controle. As médias de temperatura retal foram respectivamente de $38,5^{\circ}\text{C}$ e $38,4^{\circ}\text{C}$ para os animais controle e insulados, não diferindo estatisticamente. As temperaturas médias da superfície escrotal para animais controle e insulados foram de $32,4^{\circ}\text{C}$ e $36,4^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$), de modo que durante o período de insulação as temperaturas da superfície do escroto variaram de $35,1^{\circ}\text{C}$ a $38,4^{\circ}\text{C}$ para o grupo insulado. Houve redução de consistência do parênquima testicular dos animais tratados, mas não foi detectada diferença na biometria testicular entre animais controle e tratados ($31,9\text{ cm} \times 32,1\text{ cm}$). A motilidade e o vigor espermáticos dos animais tratados foram reduzidos com 7 dias após a insulação. Houve astenozoospermia transitória porém, 63 dias após a insulação, a motilidade e o vigor começaram a se restabelecer gradualmente. Os defeitos maiores, menores e totais só retornaram ao normal no dia 148 após a insulação, de modo que as anomalias que tiveram incremento mais expressivo depois do tratamento foram defeito de acrossomo, defeitos de cabeça (subdesenvolvida, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal, “*pouch formation*”, isolada patológica, isolada normal, delgada, gigante e pequena), defeitos de peça intermediária, defeitos de

cauda (dobrada com gota, fortemente dobrada ou enrolada), além de gota protoplasmática proximal, gota protoplasmática distal e formas teratológicas.

Wildeus e Entwistle (1983) trabalharam com animais mestiços *Bos indicus* X *Bos taurus* insulados por 48 horas. O sêmen foi colhido a cada 2 ou 3 dias e todos os touros foram abatidos 23 dias após a insulação. Não houve efeito negativo na produção diária de espermatozóides dos animais insulados durante o período estudado, mas o aumento de temperatura testicular ocasionou o aparecimento das seguintes anomalias espermáticas: cabeças isoladas (6 a 14 dias pós insulação), defeitos de acrossomo (12 a 23 dias), anomalias de cauda (12 a 23 dias) e gotas protoplasmáticas (17 a 23 dias). As espermátides e os espermatozóides na cabeça do epidídimo foram mais sensíveis à elevação da temperatura. Houve redução de aproximadamente 50% do número de células estocadas no epidídimo, supostamente devido à absorção seletiva de espermatozóides anormais na *rete testis* e no ducto deferente.

Em estudo para comparar os efeitos da temperatura e do estresse sobre a espermatogênese, Barth e Bowman (1994) insularam um grupo de animais durante 4 dias enquanto outro grupo foi tratado com dexametasona (20mg/dia durante 7 dias). O sêmen dos animais foi colhido por eletroejaculação 2 ou 3 vezes por semana durante seis semanas. Apesar de alguns touros terem demonstrado maior predisposição em produzir espermatozóides com anomalias particulares, para os animais insulados a natureza das anomalias detectadas e o tempo para início de manifestação das mesmas foram os seguintes: cabeça isolada (9 a 11 dias após a insulação), gota protoplasmática proximal (10 a 13 dias), gota protoplasmática distal (11 dias), defeito de peça intermediária (11 a 13 dias), defeito na bainha mitocondrial (14 a 23 dias), *knobbed* acrossomo (18 a 21 dias), vacúolos nucleares (18 a 25

dias), cabeça piriforme (20 a 29 dias), cabeça pequena (21 dias), formas teratológicas (23 dias), cauda enrolada (23 a 29 dias) e condensação anormal de DNA (28 a 30 dias).

Já Bonilla et al. (2004) estudaram o efeito do estresse térmico induzido por insulação testicular sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de três touros holandeses jovens durante 70 dias. A insulação teve duração de 120 horas e durante esse procedimento a temperatura da superfície escrotal variou entre 34,6 e 39,9°C. Os autores não observaram variação no perímetro escrotal dos animais ($P>0,05$). A motilidade e o vigor espermático foram reduzidos imediatamente após a insulação. Houve aumento na incidência de gotas protoplasmáticas proximais logo após a retirada das bolsas insuladoras, porém começaram a diminuir 7 dias após o término da insulação. Também 7 dias após o final da insulação houve incremento no percentual de anomalias de cabeça. Vinte e oito dias após a insulação foram detectados nos ejaculados dos três touros queda da concentração espermática e grande quantidade de células primordiais, células epiteliais, leucócitos e células gigantes. Os defeitos de maior frequência foram cabeças delgadas, cabeças patológicas, implantação abaxial e defeitos de acrossomo. Apesar de não demonstrarem resultados de médio prazo após a insulação, os autores concluíram que a degeneração testicular induzida pelas bolsas insuladoras em seu experimento foi transitória.

A insulação somente da região do funículo espermático também pode ser usada como alternativa para indução do estresse térmico testicular. Usando esta técnica, a partir do quinto dia consecutivo de elevação térmica há a diminuição da porcentagem de espermatozóides normais ejaculados ($P<0,08$), aumento da porcentagem de defeitos de cabeça ($P<0,06$), aumento a incidência de gotas

protoplasáticas ($P < 0,08$), mas sem afetar imediatamente a motilidade espermática (KASTELIC et al., 1996). A diminuição da qualidade seminal está sempre relacionada com a severidade da injúria térmica. A exposição prolongada a altas temperaturas ambientes e à umidade pode prejudicar a espermatogênese e reduzir a qualidade seminal (ROBERTS, 1986).

Sêmen de touros em estresse térmico tem problemas não somente de morfologia, mas também de funcionalidade bioquímica. Baseados na comprovação de que o sêmen de touros férteis tem maior afinidade de ligação aos glicosaminoglicanos, Ax; Gilbert e Shook (1987) avaliaram ao longo do ano a ligação da heparina aos espermatozóides de touros. Nos períodos críticos e de calor intenso (verão), as temperaturas ambientais elevadas determinaram o estresse térmico dos animais e conseqüente elevação da porcentagem de espermatozóides anormais, atingindo um máximo de 67%, computadas as anormalidades primárias e secundárias. À medida que as anormalidades espermáticas aumentaram durante o estresse, o número de sítios de ligação de heparina aos espermatozóides diminuiu, a afinidade das ligações espermatozóide-heparina foi significativamente reduzida e a motilidade seminal também decresceu significativamente. As alterações de afinidade bioquímica dos espermatozóides aos glicosaminoglicanos determinadas pelo estresse térmico podem explicar parcialmente a baixa qualidade do sêmen de touros submetidos a estresse térmico testicular, ou de animais que são inseridos em um meio ambiente ao qual ainda não se encontram completamente adaptados.

3.10 A SOMATOTROPINA E AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS MASCULINAS

A somatotropina ou hormônio do crescimento é fundamental para os processos de crescimento corporal e desenvolvimento. A somatotropina é também necessária para a diferenciação e maturação sexual dos indivíduos, participando de forma direta ou indireta na esteroidogênese e na gametogênese.

Para bovinos em condição fisiológica, a concentração média de GH no sangue é alta ao nascimento e declina conforme se aproxima o período de maturidade sexual. Em bezerros, a diminuição na secreção do GH se inicia com 12 semanas de idade e por isso os níveis basais desse hormônio decrescem. Essa redução se acentua entre 12 e 42 semanas de vida, quando há um declínio na amplitude dos pulsos de liberação de GH. Entretanto, a frequência dos pulsos aumenta entre 1 a 12 semanas de idade, período após o qual permanece constante durante toda vida (MCANDREWS et al., 1993).

Sabe-se que ratos da linhagem *dw/dw* são seletivamente deficientes para produção de GH, porém apresentam níveis séricos e testiculares de testosterona considerados normais (BARTLETT et al., 1990). Apesar de seu comportamento sexual e libido serem normais, produzem ninhadas com números reduzidos de filhotes, indicando uma possível associação entre menor prolificidade e decréscimo nos níveis de GH.

Gravance et al. (1997) demonstraram que ratos deficientes em GH apresentam concentração e motilidade espermática significativamente menores que animais normais, além de maior número de espermatozóides anormais (principalmente cabeças isoladas, defeitos de peça intermediária e anomalias de

cabeça), sugerindo que na ausência do GH a função dos espermatozóides pode ser notadamente prejudicada. Visto que a fertilidade do sêmen está ligada à morfologia do espermatozóide, além do ambiente ao qual está submetido e seu metabolismo, especula-se atualmente que a somatotropina seja o maior regulador da reprodução masculina (HULL; HARVEY, 2000).

Uma das evidências de que os processos reprodutivos no touro são influenciados não somente pela ação das gonadotrofinas, mas também pelo GH foi levantada por Al-Haboby et al. (1988). Esses autores constataram que em touros unilateralmente orquiectomizados os níveis séricos de GH se elevam antes do aumento nos níveis de FSH, como parte de uma resposta hipertrófica testicular compensatória. O GH também parece ter importância durante o ato sexual, pois a exposição de touros a vacas em cio aumenta instantaneamente em duas vezes a concentração basal do GH sérico, enquanto a realização de um ou mais serviços seguido de ejaculação é um estímulo que induz a secreção momentânea de GH nesses animais (BORG; ESBENSHADE; JOHNSON, 1991).

A aplicação de somatotropina exógena parece exercer efeito variável sobre a função testicular nas diferentes espécies. Estudos em humanos mostram que para indivíduos sadios (OVESEN et al., 1993) ou subférteis (OVESEN et al., 1996), o tratamento com somatotropina exógena não afeta os padrões de gonadotrofinas e de testosterona, mas aumenta os níveis séricos de IGF-1 e de proteína ligante à IGF (IGFBP-3), além dos níveis de IGF-1 no plasma seminal dos indivíduos com problemas reprodutivos (OVESEN et al., 1996). Há relatos de que a administração deste hormônio induz a aumento na secreção de testosterona em hamsters (OH et al., 1995) e ratos (OHYAMA et al., 1995).

Swanlund et al. (1995) afirmam que a somatotropina exógena promove a maturação tubular e das células de Sertoli, caracterizada pela hipertrofia das células, aumento na formação de lúmen e início de espermatogênese. Isso porque leitões tratados com somatotropina apresentam maior diâmetro de testículos, massa relativa de espermatócitos e espermátides 2,5 vezes maior do que animais controle, sem haver alteração em tecidos intersticiais.

Em ratos e humanos, a somatotropina comprovadamente exerce influência positiva nos parâmetros seminais essenciais à fertilidade. Após aplicação de somatotropina exógena, a motilidade espermática foi consideravelmente melhorada no sêmen de ratos deficientes (BREIER et al., 1996) e de homens astenozoospermicos (OVESEN et al., 1998).

Já em bovinos, segundo Macdonald e Deaver (1993), a administração diária de somatotropina recombinante bovina durante 28 semanas é capaz de elevar a concentração plasmática de GH e de IGF-1 em touros jovens, porém não altera a concentração de testosterona nem as variáveis relacionadas ao desenvolvimento da gônada masculina, como o comprimento e a largura testicular, o peso dos testículos e o peso do parênquima testicular. Ainda segundo o mesmo trabalho, o número de espermátides produzidas por grama de parênquima testicular e a produção diária de espermatozóides não são incrementados após a aplicação da somatotropina. Também não há efeito da somatotropina sobre o número de células de Sertoli presentes por secção do epitélio seminífero nem sobre os níveis séricos de testosterona, demonstrando que a somatotropina recombinante não influencia a mitose das células indiferenciadas de Sertoli nem a esteroidogênese executada pelas células de Leydig. A somatotropina também não determina fragmentação na

estrutura do DNA durante a espermatogênese, mensurada por meio de análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA).

Santos et al. (1999) testaram em touros zebuínos o efeito em curto prazo de duas aplicações de somatotropina recombinante sobre os níveis hormonais e o número de células testiculares da linhagem germinativa, morfologia testicular e apoptose das células testiculares. Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos tratamento e controle para as variáveis morfológicas, incluindo diâmetro dos túbulos seminíferos, comprimento do epitélio seminífero e proporções volumétricas de interstício, epitélio seminífero e lúmen. O tratamento com somatotropina também não demandou diferença nos números de espermátides não alongadas, espermátócitos em paquíteno, espermátócitos em preleptóteno, espermátogônias tipo A e células de Sertoli no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. O padrão de apoptose nas células da linhagem germinativa foi o mesmo para animais tratados ou não com somatotropina. Não houve nenhuma diferença significativa nos níveis séricos de FSH e LH, enquanto os animais tratados com somatotropina apresentaram incremento na secreção de IGF-1 ($P<0,01$).

Em estudo realizado por Sauerwein et al. (2000), os efeitos da aplicação quinzenal de somatotropina exógena em touros sobre as características espermáticas, hormônios do plasma sangüíneo e do plasma seminal foram observados. O estudo durou 25 semanas e houve aumento nas concentrações sangüíneas de testosterona, insulina, GH, além de IGF-1 e glicose nos animais tratados. O tratamento determinou elevação das concentrações de frutose, citrato e IGFBP-3 no plasma seminal. Nos animais tratados, observou-se aumento na concentração espermática e redução significativa na taxa de anormalidades morfológicas espermáticas, principalmente defeitos de acrossomo. A motilidade

espermática foi incrementada nos animais tratados (de $58,0 \pm 3,0\%$ para $61,9 \pm 1,4\%$), enquanto se manteve praticamente estável para os animais controle (de $64,0 \pm 2,2\%$ para $62,9 \pm 1,0\%$). Houve uma sensível melhora na taxa de não retorno ao cio de fêmeas inseminadas com sêmen congelado após o tratamento dos touros, em comparação aos animais não tratados ($73,2 \pm 0,04\%$ contra $68,2 \pm 0,08\%$; $P < 0,001$). Os autores concluíram que o uso da somatotropina pode melhorar as taxas de fertilização, por agir de forma direta ou indireta nas características das células espermáticas ou por favorecer o metabolismo espermático ao interferir positivamente na composição do plasma seminal.

3.11 AS SONDAS FLUORESCENTES NO MONITORAMENTO DE MEMBRANAS E CROMATINA DOS ESPERMATOZÓIDES

Sabe-se que touros férteis têm mais espermatozóides viáveis e uma menor incidência de espermatozóides morfolologicamente anormais que touros inférteis ou subférteis (SAACKE, 1982). Apesar da indubitável importância da morfologia espermática normal para a fertilidade do indivíduo, em muitos casos tem-se observado que a avaliação da taxa de espermatozóides anormais no ejaculado pode ser um indicador frágil da aptidão reprodutiva de touros, especialmente para os animais de raça pura.

Horn; Moraes e Macie (2002) estudaram grupos de touros de raça pura e grupos de touros de raça sintética considerados aptos ou inaptos à reprodução, classificados segundo seu espermiograma. O estudo foi conduzido durante seis meses consecutivos e foi constatado que ao final do experimento os animais de raça

pura classificados como inaptos no início do trabalho tenderam a se igualar aos touros aptos em relação à porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais no ejaculado. Desta forma, seriam necessários indicadores mas sensíveis da condição seminal de touros e que pudessem triá-los de maneira mais adequada, de modo a apontar alterações de funcionalidade nos compartimentos celulares e/ou organelas dos espermatozóides.

Dentro deste princípio, o uso de sondas fluorescentes surge como moderna alternativa de análise espermática. A integridade estrutural e a funcionalidade de organelas dos espermatozóides ou de seus compartimentos têm sido monitoradas por procedimentos de coloração específicos. Por exemplo, nas espécies que possuem espermatozóides com acrossomo muito pequeno (rato, homem, touro e cavalo), não é possível visualizar danos acrossomais usando microscopia óptica. Assim, técnicas para marcação do acrossomo têm sido usadas para permitir a sua visualização sob microscopia de epifluorescência (CASEY et al., 1993).

Para avaliação da integridade do acrossomo têm sido usadas com sucesso as lecitinas, as quais se ligam a glicoconjugados da matriz acrossomal externa ou à membrana externa do acrossomo (CROSS et al., 1986), produzem coloração fluorescente de grande intensidade, imprimem maior contraste que as colorações simples e produzem padrões menos ambíguos de interpretação (CROSS; MEIZEL, 1989). A primeira lecitina conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) utilizada para a detecção do *status* acrossomal foi a lecitina de *Ricinus communis*. Dada sua toxicidade e os cuidados requeridos em seu manuseio, essa lecitina foi substituída convenientemente pelas lecitinas de *Peanut* aglutinina (PNA) e de *Pisum sativum* aglutinina (PSA). A lecitina fluorescente *Pisum sativum* aglutinina (FITC-PSA) tem funcionado adequadamente em espermatozóides de humanos (CROSS et al., 1986),

macacos (CROSS et al., 1989), eqüinos (ARRUDA, 2000; FARLIN et al., 1992) e bovinos (ARRUDA; CELEGHINI, 2003), entre outras espécies.

Farlin et al. (1992) investigaram o uso da lecitina fluorescente *Pisum sativum* aglutinina para avaliar a integridade do acrossomo e a viabilidade de células espermáticas a fresco ou submetidas à crioinjúria. Para tanto, misturas de diferentes proporções de espermatozóides com acrossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozóides com acrossomo danificado (sêmen congelado-descongelado) foram avaliadas. Houve correlação positiva entre a percentagem de espermatozóides ligados ao FITC-PSA e a proporção de espermatozóides com acrossomo danificado nas amostras ($r = 0,98$; $P < 0,05$), comprovando a eficiência do uso do FITC-PSA na determinação da integridade do acrossomo de espermatozóides.

Como a integridade da membrana plasmática parece exercer papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAN, 1992), os corantes fluorescentes podem ser usados em combinação com o iodeto de propídio (PI), um fluorescente de alta intensidade e impermeável à membrana plasmática, o qual se acopla ao DNA somente de espermatozóides de membrana danificada (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999).

Quatro diferentes técnicas de coloração para detectar concomitantemente a integridade do acrossomo e a viabilidade de espermatozóides bovinos durante a capacitação *in vitro* foram testadas por Way; Henault e Killian (1995). Os procedimentos utilizados foram: Fast Green + Eosina B, Eosina B + Anilina Azul, Azul de Tripán + Giemsa e Iodeto de Propídio + *Pisum sativum* aglutinina (PI/PSA). Os espermatozóides foram corados pelos diferentes métodos e classificados como:

intactos vivos, intactos mortos, vivos com acrossomo reagido e mortos com acrossomo reagido. Quando coradas com PI/PSA, células vivas e intactas não emitiram fluorescência, enquanto células mortas e intactas fluoresceram em verde. Espermatozóides vivos e com acrossomo reagido exibiram fluorescência verde na região acrossomal e não coraram na região pós-acrossomal. Espermatozóides mortos e com acrossomo reagido fluoresceram em verde na região acrossomal e vermelho na região pós-acrossomal. Desta forma, o método PI/PSA foi considerado bastante adequado para avaliar a viabilidade espermática e a integridade do acrossomo.

A eficiência da avaliação de integridade acrossomal e de viabilidade espermática através do uso de fluorescentes foi também estudada por Sukardi; Curry e Watson (1997). A combinação dos fluoróforos FITC-PSA e PI foi usada em amostras de espermatozóides tratados com cálcio ionóforo para indução da reação de acrossomo. Segundo os autores, ao microscópio de fluorescência, a combinação das duas sondas fluorescentes possibilitou fácil diagnóstico de integridade do acrossomo e de viabilidade espermática. Em virtude de ambos os fluoróforos serem excitados a um mesmo comprimento de onda (488 nm) e dos resultados bastante satisfatórios, os autores concluíram que a combinação FITC-PSA/PI pode ser usada para avaliar simultaneamente integridade acrossomal e viabilidade espermática.

Com objetivo de desenvolver uma técnica rápida e precisa para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial das células espermática de bovino, Arruda e Celeghini (2003) utilizaram recentemente o iodeto de propídio (corante que se liga especificamente ao DNA, não atravessa a membrana plasmática íntegra e marca células mortas), o *Pisum sativum* aglutinina (corante que possui especificidade a glicoproteínas da membrana

acrossomal quando conjugada a uma fluoresceína isotiocianatada e marca o acrossomo lesado) e o Mito Tracker Green FM (corante que tem especificidade à membrana mitocondrial ativa). Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão e apresentaram para integridade de membrana plasmática a equação $Y=0,40+0,79X$ e $R^2=0,95$; para integridade de acrossomo $Y=8,51+0,81X$ e $R^2=0,95$ e para potencial de membrana mitocondrial $Y=35,0+0,55X$ e $R^2=0,84$. Baseados nas equações e no alto coeficiente de determinação, os autores concluíram que esta técnica é eficiente para a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossômica e mitocondrial em espermatozóides bovinos.

Em relação à estrutura nuclear, vários autores já hipotetizaram que espermatozóides que possuem núcleos irregulares apresentam cromatina com estrutura alterada e que essas alterações poderiam ser detectadas por padrões anormais de desnaturação do DNA em testes específicos (EVENSON et al., 1980; GLEDHILL; DARZYNKIEWICZ; RINGERTZ, 1971).

Gledhill (1972) estudou o efeito do desafio térmico sobre a integridade da cromatina em espermatozóides bovinos usando o corante acridina laranja. Ao submeter o sêmen coletado diretamente do testículo, do epidídimo, da *rete testis* ou do ejaculado a temperaturas crescentes que variavam de 22 a 100°C, a desnaturação térmica foi capaz de induzir a fragmentação da cromatina em espermatozóides de morfologia normal ou anormal, principalmente nas células mais imaturas.

Segundo Evenson (1980), não somente o DNA de células de morfologia irregular tem uma menor resistência à desnaturação térmica, mas muitos espermatozóides normais de doadores subférteis também são anormalmente susceptíveis à desnaturação térmica de seu DNA, sendo que a sensibilidade da

cromatina ao estresse térmico pode ser um determinante adicional da fertilidade. A fragmentação da cromatina pode ser detectável pelo uso da acridina laranja, um corante metacromático que interage com o DNA e com o RNA por intercalação ou atrações eletrostáticas. Quando ligada à dupla fita íntegra do DNA, a acridina laranja fluoresce em verde e, quando ligada à fita simples do DNA, sua fluorescência passa a ser em vermelho. Quando a cromatina se encontra condensada, o DNA é tão compactado que não permite uma intercalação eficiente da acridina laranja (HAUGLAND, 1996).

Segundo Evenson (1980), ao usar a coloração de acridina laranja o nível de desnaturação do DNA *in situ* pode ser determinado pelo índice denominado α_1 , o qual é a relação entre o número de células com fluorescência em vermelho e o número total de células com fluorescência, e pode variar experimentalmente entre 0,1 (DNA pouco desnaturado) e 0,9 (DNA altamente desnaturado), comuns respectivamente para touros férteis e subférteis. Esta relação pode ser detectada através de citometria de fluxo e este ensaio de avaliação da estrutura da cromatina espermática é conhecido como SCSA, do termo em inglês *Sperm Chromatin Structure Assay*. Mas, a metacromasia da acridina laranja em espermatozóides pode ser também observada com o uso da microscopia de epifluorescência (TEJADA et al., 1984).

O grau de desnaturação da cromatina de células espermáticas que foram expostas ao ácido ou ao calor representa uma forma de mensuração da subfertilidade de um macho. Em touros, a porcentagem de células espermáticas com estrutura anormal de cromatina foi relacionada por Ballachey; Evenson; e Saacke (1988) a um índice de fertilidade dos animais. Bochenek; Smorag e Pilch, (2001) também encontraram uma correlação significativa entre os resultados da SCSA e a

fertilidade em touros, além de detectar níveis de 23,8% de espermatozóides com defeitos de cromatina em ejaculados convencionalmente analisados de touros qualificados e aprovados para doação de sêmen em centrais de inseminação artificial.

Poucos são os trabalhos que correlacionam os efeitos do estresse térmico testicular, a estrutura da cromatina e a susceptibilidade do DNA à desnaturação *in situ* que pode ser mensurada com o ensaio de SCSA. Em bovinos, Karabinus; Evenson e Kaproth (1997) observaram que a susceptibilidade da cromatina à desnaturação foi maior nos espermatozóides colhidos após período de insulação testicular realizada por 48 horas e que os efeitos negativos do estresse térmico testicular sobre a integridade da cromatina se manifestaram mais rapidamente que os efeitos sobre as características seminais convencionalmente analisadas.

Por isso, segundo Fossa et al. (1997), o uso da acridina-laranja pode auxiliar na identificação de indivíduos portadores de distúrbios muito sensíveis ocorridos durante o processo da espermatogênese. Já Tejada et al. (1984) citam que o teste pode ser aplicado para controlar a qualidade do sêmen, para melhor compreender certos tipos de infertilidade masculina, para checar a condição do sêmen usado na fertilização *in vitro* e para diagnosticar indivíduos que apresentem espermogramas normais e fertilidade reduzida.

Recentemente, Waberski et al. (2004) utilizaram a acridina laranja para avaliação de integridade da cromatina, associada a teste hiposmótico e a testes rotineiros de avaliação seminal a fim de tentar estabelecer correlação com capacidade de adesão a células do oviduto e fertilidade *in vitro*. Sêmen de 30 touros foram avaliados, de modo que houve diferença individual significativa na habilidade dos espermatozóides dos distintos touros em se ligarem a células de oviduto. Houve

correlação negativa entre instabilidade da cromatina e capacidade de ligação a células ovidutais ($P < 0,05$). Os touros cujos espermatozóides demonstraram alta capacidade de ligação a células do oviduto tiveram taxas de formação de blastocistos significativamente maiores que os touros de baixa capacidade de ligação ($P < 0,05$). Isso indica que touros com cromatina fragmentada têm menor capacidade de ligação às células do oviduto *in vitro* e, conseqüentemente, menor capacidade de formação de blastocistos. Baseados nas correlações realizadas entre os resultados da avaliação de integridade da cromatina, do teste hiposmótico e do teste de adesão a células do oviduto, os autores sugeriram que aumento na porcentagem de espermatozóides com instabilidade de cromatina pode também estar associado a distúrbios funcionais da membrana plasmática.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 LOCAL E PERÍODO

O trabalho experimental foi desenvolvido no *Campus* da Universidade de São Paulo localizado na cidade de Pirassununga, Estado de São Paulo (21°56'13" Sul / 47°28'24" Oeste).

O clima da região é do tipo tropical de altitude e, de acordo com a classificação de Koppen, é representado pela sigla Cwa, que expressa região de clima tropical com temperaturas médias entre 19°C e 27°C e chuvas concentradas em verões quentes (ADAS, 1983). Historicamente, a temperatura média anual do município é de 21,74°C e a precipitação pluviométrica anual situa-se entre 1300 e 1500 milímetros³

O manejo dos animais e a coleta de sêmen foram realizados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, pertencente ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

As análises imediatas de sêmen e de microscopia de contraste de fase foram executadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LBSA-FMVZ-USP).

³ FONTE: Banco de Dados Climáticos do Brasil (www.bdclima.cnpm.embrapa.br, acesso em 09/11/2003).

As análises de microscopia de epifluorescência foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP).

O período experimental se estendeu do dia 14 de novembro de 2003 ao dia 16 de abril de 2004, totalizando 154 dias. Para efeito de análise estatística, este período é apresentado dividido em 22 semanas.

4.2 ANIMAIS E MANEJO ZOOTÉCNICO

Um lote padronizado de 16 touros Simental (*Bos taurus taurus*) puros de origem e com idade de 34 ± 10 meses foi utilizado (vide figura 1), de modo que os animais serviram como doadores de sêmen. Os animais foram mantidos em lote único sob regime de pastejo extensivo, com taxa de lotação de 3,00 unidades animais/hectare em áreas de pastagens com predominância de capim braquiária (*Brachiaria brizantha* var. marandu).

Figura 1 - Fotografia do lote de touros utilizados demonstrando a homogeneidade dos animais quanto ao padrão racial, ao tamanho e à idade (A) e de touro individualizado (B).

A alimentação foi constituída por forragem verde e ração concentrada, atendendo as recomendações para a categoria. Os animais foram mineralizados através do fornecimento de suplemento em cochos coletivos e o acesso dos animais à água foi *ad libitum*. A condição corporal de cada touro foi avaliada semanalmente e pesagens individuais foram realizadas a cada quinze dias.

O acesso permitido dos animais à sombra foi mínimo, a fim de evitar disputa entre os animais por área sombreada e interferências climáticas externas durante o período de insulação testicular.

O programa sanitário obedeceu às prerrogativas normais de prevenção para a espécie.

4.3 POTENCIAL FERTILIDADE DOS ANIMAIS E CRITÉRIO DE DISTRIBUIÇÃO NOS TRATAMENTOS

Previamente ao trabalho experimental, os touros foram avaliados de acordo com sua capacidade reprodutiva em duas oportunidades e classificados quanto a sua potencial fertilidade através de exame andrológico completo, segundo critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), cujos padrões andrológicos recomendados estão expressos no Quadro 1.

VARIÁVEL	VALORES MÉDIOS RECOMENDADOS (CBRA)
Volume seminal (mL)	5
Movimento de massa (0 a 5)	Presente
Vigor (0 a 5)	3
Número total de espermatozóides	7×10^9
Motilidade espermática (%)	70%
Espermatozóides normais (%)	80%
Biometria testicular – perímetro escrotal (cm)	Mínimo de 32 cm*
Biometria testicular – perímetro escrotal (cm)	Mínimo de 33 cm**

* Dados para touros *Bos taurus taurus* com idade entre 21 e 30 meses.

** Dados para touros *Bos taurus taurus* acima de 30 meses.

Quadro 1 – Características reprodutivas avaliadas e padrões mínimos considerados para a inserção dos touros no experimento – LBSA-FMVZ-USP, Pirassununga - 2004

Estando dentro dos padrões mínimos recomendados, os touros foram aprovados para a distribuição nos grupos. Foram usados como referência os valores médios dos ejaculados de duas semanas consecutivas de cada touro (semanas 4 e 5), os quais compuseram um índice para cada animal. Este índice foi calculado através da seguinte fórmula:

$$NOTA DO TOURO = (3 \times TDMA) + (2 \times TDME) + (1 \times IM), \text{ onde:}$$

TDMA: Total de defeitos maiores;

TDME: Total de defeitos menores;

IM: Inverso da motilidade.

Como a formação do índice considerou totais de defeitos e o inverso da motilidade, entende-se que quanto menor a nota do touro no índice formulado, melhores suas características seminais. Com base nas notas obtidas, os animais foram classificados e subdivididos em quatro blocos. A partir de cada bloco, os animais foram distribuídos por sorteio em quatro grupos de tratamentos

experimentais, a saber: Grupo Controle (CONT), Grupo Insulação Testicular (INSUL), Grupo Somatotropina (bST) e Grupo Insulação Testicular + Somatotropina (IbST), como demonstrado na tabela 1. Cada grupo foi constituído, portanto, de quatro animais ($n = 4$).

Tabela 1 – Classificação dos touros segundo nota obtida em índice preestabelecido e distribuição dos animais em blocos e grupos experimentais. Pirassununga, 2004

TOURO	TDMA ⁽¹⁾	TDME ⁽²⁾	IM ⁽³⁾	NOTA ⁽⁴⁾	BLOCO ⁽⁵⁾	GRUPO ⁽⁶⁾
A137	2	2	25	35	4	BST
B91	2	3	27,5	39,5	4	IbST
A149	4	3	25	43	4	INSUL
A144	3	1	32,5	43,5	4	CONT
A20	7	0	25	46	3	CONT
B18	6	4,5	25	52	3	BST
A159	4,5	4,5	30	52,5	3	IbST
A99	6	4	27,5	53,5	3	INSUL
B25	4	6	32,5	56,5	2	INSUL
B1A	7,5	2,5	30	57,5	2	CONT
B5	4,5	5,5	35	59,5	2	BST
B3	4,5	13	25	64,5	2	IbST
A151	8,5	9,5	32,5	77	1	IbST
A67	16,5	9	27,5	95	1	INSUL
B23	16	15	37,5	115,5	1	CONT
A120	17	16	37,5	120,5	1	BST

(1) TDMA: total de defeitos maiores.

(2) TDME: total de defeitos menores.

(3) IM: inverso da motilidade.

(4) NOTA: nota atribuída a cada animal, calculada através da fórmula $(3 \times \text{TDMA}) + (2 \times \text{TDME}) + (1 \times \text{IM})$.

(5) BLOCO: distribuição dos animais em blocos, para efeito de análise estatística.

(6) GRUPO: distribuição dos animais em diferentes grupos, para efeito de tratamento experimental (CONT: Grupo Controle; INSUL: Grupo Insulação Testicular; bST: Grupo Somatotropina e IbST: Grupo Insulação Testicular + Somatotropina).

4.4 TRATAMENTOS

Os animais do Grupo CONT (n = 4) não foram submetidos à insulação testicular e receberam solução fisiológica (placebo) no mesmo volume do bST nos dias 63, 77, 91, 105 e 119.

Os touros do Grupo INSUL (n = 4) foram submetidos à insulação testicular por 96 horas entre os dias 36 e 40 e receberam solução fisiológica (placebo) no mesmo volume do bST nos dias 63, 77, 91, 105 e 119.

Os animais do Grupo bST (n = 4) não foram submetidos à insulação testicular e receberam aplicações de somatotropina recombinante bovina⁴ (dose: 1,2 mg/Kg PV) nos dias 63, 77, 91, 105 e 119.

Os touros do Grupo IbST (n = 4) foram submetidos à insulação testicular durante 96 horas entre os dias 36 e 40 e receberam aplicações de somatotropina recombinante bovina (dose: 1,2 mg/Kg PV) nos dias 63, 77, 91, 105 e 119.

Os tratamentos experimentais estão resumidos no Quadro 2.

GRUPOS*	INSULAÇÃO TESTICULAR**	APLICAÇÃO DE bST***
CONT	Não	Não
INSUL	Sim	Não
BST	Não	Sim
IbST	Sim	Sim

* CONT: Grupo Controle; INSUL: Grupo Insulação Testicular; bST: Grupo Somatotropina e IbST: Grupo Insulação Testicular + Somatotropina.

** Insulação testicular por 96 horas entre os dias 36 e 40.

*** Aplicação de somatotropina recombinante bovina (Lactotropin[®], dose: 1,2 mg/Kg PV) nos dias 63, 77, 91, 105 e 119.

Quadro 2 – Grupos de tratamentos experimentais e procedimentos realizados em cada tratamento – LBSA-FMVZ-USP, Pirassununga - 2004

⁴ Lactotropin[®], Eli Lilly do Brasil, Elanco, São Paulo, Brasil.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante o estudo, todos os animais dos grupos CONT ($n = 4$), INSUL ($n = 4$), bST ($n = 4$) e lbST ($n = 4$) tiveram sêmen colhido uma vez por semana para amostragem, sempre seguindo os mesmos procedimentos. O estudo foi delineado no modelo de blocos ao acaso, em que cada animal foi considerado uma unidade experimental, com 4 repetições para cada um dos 4 tratamentos. O arranjo dos tratamentos foi do tipo fatorial 2x2 (insulação 0 ou 96 horas; bST: 0 ou 1,2 mg/Kg PV). A fim de adequar o processo de análise dos dados obtidos, o período experimental de 154 dias (22 semanas) foi dividido em quatro fases de colheita de sêmen (vide figura 2):

FASE PRÉ-INSULAÇÃO: colheitas do dia 7 ao dia 35 do experimento (semanas 1 a 5), em que o dia 1 corresponde ao dia de início do experimento; período anterior à execução da insulação testicular dos animais dos grupos INSUL e lbST.

FASE PRÉ-TRATAMENTO: colheitas do dia 36 ao dia 63 (semanas 6 a 9); período durante o qual houve a colocação da bolsa insuladora por 96 horas nos animais dos grupos INSUL e lbST e que antecedeu o tratamento dos animais dos grupos bST e lbST com somatotropina recombinante bovina.

FASE TRATAMENTO: colheitas do dia 64 ao dia 119 (semanas 10 a 17); período durante o qual houve aplicação de somatotropina recombinante bovina nos animais dos grupos bST e lbST a cada duas semanas.

FASE PÓS-TRATAMENTO: colheitas do dia 120 ao dia 154 (semanas 18 a 22), em que o dia 154 corresponde ao dia final do experimento.

Assim, os touros tiveram sêmen coletado ao longo de 22 semanas e seus perfis espermáticos monitorados, de forma a estabelecer o grau de comprometimento individual da espermatogênese.

Figura 2 - Resumo ilustrativo do período experimental e dos procedimentos experimentais adotados. Pirassununga, 2004

4.6 INDUÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR

Para a indução do estresse térmico testicular adotou-se a técnica de insulação testicular, a qual é ideal para estudos de efeito de calor nos testículos na espécie bovina sem que ocorram alterações em outros sistemas fisiológicos (SETCHELL, 1998). Para tal, foi utilizada uma bolsa insuladora de material isolante, onde os testículos dos touros foram alojados e completamente envolvidos, a fim causar elevação da temperatura na região da bolsa escrotal e sua manutenção uniforme.

Apesar de alguns autores já terem trabalhado com esse dispositivo (BRITO et al., 2003; GABALDI, 1999; JANUSKAUSKAS et al., 1995; KASTELIC et al., 1996; RAO, 1967; VOGLER; SAACKE; BAME 1993), os trabalhos consultados na literatura não apresentavam metodologia detalhada em relação a sua confecção ou indicavam a confecção com materiais considerados frágeis para o uso em touros a campo. Assim, foi elaborado um protótipo próprio de bolsa insuladora que conjugasse os princípios de isolamento térmico à rusticidade e fosse adequada ao presente trabalho.

O modelo de bolsa insuladora considerado propício foi concebido confeccionado em formato de saco com dimensões de 32cm x 23cm x 6cm (comprimento x largura x profundidade), sendo composto de três camadas distintas: a camada externa foi feita de material impermeável à água (bagun), para evitar o acúmulo de umidade; a camada intermediária foi feita de material isolante térmico, para minimizar a dissipação do calor do testículo para o meio ambiente; a camada

interna foi feita com um material macio e antiabrasivo, para evitar irritação tecidual ao entrar em contato direto com a pele do animal.

A bolsa possuía ainda uma fenda lateral com ajuste de velcro para facilitar a colocação nos animais. Uma tira plástica com passantes e ajuste de velcro foi costurada na parte superior da bolsa, de modo que a mesma pudesse ser colocada nos animais sem promover compressão testicular e fosse fixada na região do funículo espermático. Todas as costuras foram realizadas na parte externa da peça, a fim de evitar arremates internos pontiagudos, cortantes ou abrasivos que pudessem lesar os testículos dos animais durante o período de insulação.

Detalhes do modelo da bolsa insuladora confeccionada podem ser observados na figura 3.

Figura 3 - Fotografias de modelo de bolsa insuladora confeccionada mostrando a camada interna antiabrasiva e a camada externa impermeável (A), e o sistema de fechamento com tira plástica e velcro largo (B e C).

Após costurar as bolsas, testou-se a perfeita coaptação da mesma sobre o escroto e os testículos dos touros, de modo a garantir o contato direto e permanente com a pele, a fim de minimizar as trocas calóricas entre a pele escrotal e o meio ambiente.

Depois de acoplada, a bolsa insuladora foi fixada na região do funículo espermático do animal através da tira plástica, de forma a evitar pressão externa sobre esta região e não alterar a circulação sanguínea local (vide figura 4).

Figura 4 - Fotografias mostrando a colocação da bolsa insuladora em touro (A), com detalhe para a coaptação na região do funículo espermático (B) e ajuste ao animal (C).

As bolsas foram colocadas nos touros dos grupos INSUL e IbST no dia 36 e mantidas por 96 horas consecutivas a fim de dificultar a termorregulação testicular e estimular um estresse térmico ambiental de média magnitude, com conseqüentes alterações à espermatogênese, segundo Vogler; Saacke; Bame (1993). Durante os dias de insulação testicular, as temperaturas internas das bolsas foram monitoradas com auxílio de termômetro digital e encontram-se expressas em “Resultados” (seção 5.

4.7 TRATAMENTO COM SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (BST)

Os animais dos grupos bST e lbST receberam aplicações subcutâneas de somatotropina recombinante bovina (Lactotropin®⁵, 1,2 mg/kg PV) a cada quatorze dias, desde o dia 64 ao dia 119 (semanas 10 a 17) de modo que cada animal dos grupos citados recebeu cinco aplicações de bST. Os oito touros restantes, pertencentes aos grupos CONT e INSUL, receberam solução fisiológica (placebo) por via subcutânea, nos mesmos dias em que os animais tratados. A quantidade total de bST aplicado foi ajustada a cada 14 dias, baseada no peso vivo dos animais.

4.8 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTAL E UMIDADE DO AR

Foram realizados os monitoramentos das temperaturas máxima, média e mínima, além da umidade do ar durante os dias 14 de novembro de 2003 a 16 de abril de 2004. As mensurações foram feitas em estação climatológica posicionada em 21°56'13"Sul e 47°28'24"Oeste. As informações foram colhidas ininterruptamente de forma automatizada em intervalos regulares de 10 minutos durante todo o período do experimento. Para simplificação, os dados foram sistematizados e compilados em informações diárias. As temperaturas foram registradas em graus Celsius e a umidade do ar em porcentagem.

⁵ Eli Lilly do Brasil, Elanco, São Paulo, Brasil.

4.9 MENSURAÇÃO DAS TEMPERATURAS RETAL E DA SUPERFÍCIE ESCROTAL

Durante todo o experimento, as temperaturas retal e da superfície escrotal foram monitoradas no momento imediatamente anterior à colheita de sêmen de cada touro.

A temperatura retal foi mensurada através do uso de termômetro clínico para bovinos, com escala de 36°C a 42°C e subdividida a cada 0,1°C. O termômetro foi introduzido via retal após o reto ser limpo e dentro de 2 minutos a temperatura foi lida.

Para a mensuração da temperatura da superfície escrotal, foi utilizado termômetro digital⁶ dotado de visor indicativo de cristal líquido, com escala de -40°C a 700°C, subdividida em 0,1°C e operado por bateria. O sensor térmico de 1 mm de diâmetro tinha 15 cm de comprimento e era conectado ao termômetro por um fio extensível. As temperaturas foram obtidas posicionando o sensor térmico sobre a pele do escroto na região média caudal do órgão, conforme Satrapa (1992). O sensor era disposto paralelamente ao eixo mais longo dos testículos (vide figura 5A), de modo que o operador induzia uma pequena dobra da pele escrotal, dispondo o sensor em seu interior. O sensor era mantido pressionado contra a pele por no mínimo 45 segundos, até que a temperatura no visor se estabilizasse.

⁶ Termômetro IOP Therm 42, IOPE Instrumentos de Precisão Ltda, São Paulo, Brasil.

4.10 MENSURAÇÃO DO PERÍMETRO ESCROTAL E DA CONSISTÊNCIA TESTICULAR

A fim de aferir variações que pudessem ocorrer durante o período experimental, todos os touros tiveram o perímetro escrotal mensurado antes de cada colheita de sêmen. Para tal, foi usada fita específica para a finalidade, dotada de escala em centímetros e subdivisões em milímetros. Dois observadores realizavam mensuração no mesmo animal consecutivamente e o resultado final foi dado pela média das duas observações.

Antes de cada colheita de sêmen também foi aferida a consistência testicular por palpação (vide figura 5B), de acordo com as prerrogativas para exame andrológico (CBRA, 1994). A consistência testicular foi classificada em escala de 1 (mais flácida) a 5 (mais firme) por dois observadores diferentes e o resultado médio registrado.

Figura 5 - Fotografias demonstrando procedimentos de mensuração da temperatura da superfície escrotal (A) e de avaliação da consistência testicular (B).

4.11 COLHEITA DO SÊMEN

As colheitas de sêmen foram realizadas semanalmente, iniciando sempre no mesmo horário (7h30m) e obedecendo a uma ordem constante e predefinida de entrada dos animais no brete para a colheita. O método empregado foi a eletroejaculação⁷, conforme descrito por Mies Filho (1977) e ilustrado na figura 6. O critério estabelecido para o final da colheita foi de que cada animal tivesse ejaculado um volume mínimo de 9 mL.

Figura 6 - Fotografias de equipamento (A) e procedimento (B) utilizados para colheita de sêmen por eletroejaculação.

⁷ Eletroejaculador Eletrojet®, Eletrovet, São Paulo, Brasil.

4.12 DETERMINAÇÃO DE VOLUME, CONCENTRAÇÃO E PH SEMINAL

Depois de colhido, o sêmen foi avaliado imediatamente quanto às características de volume, concentração e pH.

O volume ejaculado foi medido no momento da colheita através do uso de tubo graduado, específico para a finalidade.

Para determinação da concentração espermática, uma alíquota de 100µL de sêmen foi colhida e diluída a 1:100 em solução tamponada de formol salino (ver Anexo 1). A contagem das células foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer, sob microscopia óptica⁸ em aumento de 400X.

Para a determinação do pH, uma alíquota de 2 mL sêmen fresco foi separada em tudo plástico e a mensuração executada mediante imersão direta do eletrodo do equipamento medidor digital⁹ no tubo. Depois de mensurado o pH, o restante da alíquota foi descartado, o eletrodo foi imediatamente lavado com água destilada deionizada e seco com papel especial.

4.13 DETERMINAÇÃO DE MOVIMENTO DE MASSA, MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICOS

O sêmen recém-coletado foi mantido com temperatura controlada e estável a 37°C em banho-maria e rapidamente avaliado quanto às características de movimento de massa (turbilhonamento), motilidade e vigor das células espermáticas

⁸ Microscópio Alphaphot-2 YS2, Nikon, Tóquio, Japão.

⁹ Medidor UB-10, Denver Instrument, Arvada, Colorado, EUA.

sob microscopia de contraste de fase¹⁰ (vide figura 7A). Sendo estas análises de caráter subjetivo, foram realizadas sempre por dois técnicos, em pelo menos três campos microscópicos distintos, de modo que a estimativa final foi dada em função da leitura do campo com as melhores características.

Para avaliação do movimento de massa, uma amostra de 10µL de sêmen fresco foi depositada em lâmina pré-aquecida a 37°C e a análise foi efetivada sem lamínula, sob microscopia óptica em aumento de 40X. O movimento de massa das células foi classificado em escala que varia de 0 (movimento ausente) a 5 (máximo).

Para avaliação da motilidade espermática, uma amostra de 7µL de sêmen fresco foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. A análise foi efetivada sob microscopia óptica em aumento de 100X. O resultado da motilidade de cada amostra foi dado em função da proporção de células com movimento progressivo no melhor dos campos avaliados (em %).

O vigor espermático foi estimado concomitantemente à avaliação da motilidade, sob microscopia óptica em aumento de 100X. O resultado foi dado pela estimativa da força de movimentação progressiva individual das células móveis do ejaculado e sua classificação foi dada em uma escala que varia de 0 (ausente) a 5 (máxima).

¹⁰ Microscópio ICS Standard, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemanha.

4.14 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Para avaliar a morfologia espermática, amostras de 40µL de sêmen foram diluídas em 2mL de solução tamponada de formol salino e mantidas em refrigerador a 5°C para posterior análise (ver Anexo 1). No momento da análise, uma alíquota de 7µL da amostra com formol foi colocada entre lâmina e lamínula e a preparação úmida foi observada em microscopia de contraste de fase¹¹ sob aumento de 1000X e uso de óleo de imersão. Foram contados no mínimo 200 espermatozóides por amostra analisada.

Para a classificação morfológica das células considerou-se o contorno, a estrutura, o posicionamento e a integridade das seguintes regiões do espermatozóide: cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda. Quando presentes, estruturas com duplicação, células com formas teratológicas, além de células menos comuns ao ejaculado (hemácias, leucócitos, células de descamação epitelial, células gigantes e células imaturas da linhagem germinativa) também foram anotadas.

A classificação das células segundo sua morfologia foi realizada de acordo com a classificação preconizada por Blom (1950) e o resultado por amostra foi dado em porcentagem.

¹¹ Microscópio Zetopan-Binolux II, Reichert Optische Werke A.G., Viena, Áustria.

4.15 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

A fim de se avaliar a integridade da membrana plasmática, a integridade do acrossomo e a função mitocondrial dos espermatozóides, foram utilizados os corantes fluorescentes conjugados *Pisum sativum* aglutinina (PSA)¹², iodeto de propídio (PI)¹³ e Mito Tracker[®] Green FM (MITO)¹⁴. As amostras foram preparadas segundo técnica descrita por Arruda e Celeghini (2003), conforme procedimento descrito no Anexo 2. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência¹⁵ (vide figura 7B).

Figura 7 - Fotografias do microscópio de contraste de fase utilizado para as análises de motilidade, vigor e turbilhonamento (A) e do microscópio de epifluorescência utilizado para análises de integridade de membranas, acrossomo, função mitocondrial e integridade de cromatina (B).

¹² Código L0770 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA).

¹³ Código 08423HI (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EUA).

¹⁴ Código M-7514 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA).

¹⁵ Microscópio Axioskope, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemanha

Foram realizadas preparações úmidas com 7 μ L da amostra corada e a leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm. Foram analisadas no mínimo 200 células por lâmina e as avaliações foram feitas em objetiva ocular com auxílio de óleo de imersão, de forma que a ampliação total da imagem foi de 1000X. De acordo com a fluorescência emitida, cada espermatozóide foi classificado em uma das oito seguintes categorias expressas no Quadro 3.

Abreviatura	Categoria do espermatozóide	Coloração da célula à microscopia de epifluorescência
MAI-CP	Espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial	Cabeça: verde Acrossomo: não corado Bainha mitocondrial: verde intenso
MAI-SP	Espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial	Cabeça: verde Acrossomo: não corado Bainha mitocondrial: não corada / verde fosco
MLAI-CP	Espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial	Cabeça: verde Acrossomo: verde-amarelado Bainha mitocondrial: verde intenso
MLAI-SP	Espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial	Cabeça: verde Acrossomo: verde-amarelado Bainha mitocondrial: não corada / verde fosco
MLAI-CP	Espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial	Cabeça: vermelho Acrossomo: não corado Bainha mitocondrial: verde intenso
MLAI-SP	Espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial	Cabeça: vermelho Acrossomo: não corado Bainha mitocondrial: não corada / verde fosco
MLAL-CP	Espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial	Cabeça: vermelho Acrossomo: verde-amarelado Bainha mitocondrial: verde intenso
MLAL-SP	Espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial	Cabeça: vermelho Acrossomo: verde-amarelado Bainha mitocondrial: não corada / verde fosco

FONTE: ARRUDA R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. Acta Scientiae Veterinariae, v.31, p.230, 2003 (Suplemento) - adaptado.

Quadro 3 – Classificação dos espermatozóides em categorias quanto à integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e função mitocondrial, e padrão de coloração à microscopia de epifluorescência – LBSA-FMVZ-USP, Pirassununga – 2004

4.16 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA

Para a avaliação da integridade de estrutura da cromatina foi utilizado o corante fluorescente acridina-laranja, um corante metacromático de DNA que permite a detecção da fragmentação do DNA. A técnica de coloração com acridina-laranja foi realizada segundo descrito por Unanian (2000), conforme descrito no Anexo 3. Após prontas, as lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência com filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm, sob aumento de 1000X.

Para cada esfregaço foram avaliadas 500 células e sua classificação seguiu o método descrito por Tejada et al. (1984): as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, com cromatina íntegra. Já as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela ou seus subtons de forma regular ou irregularmente distribuídos no interior da cabeça foram consideradas anormais, pois acusavam fragmentação da cromatina. Células que emitiram fluorescência verde, porém com gotas citoplasmáticas proximais coradas em vermelho foram classificadas como normais, pois o RNA contido nas gotas se cora em vermelho.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o uso do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos

resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). Os dados (variáveis dependentes) que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidos à transformação logarítmica [$\text{Log}(x+1)$]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. A 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). 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 2.

Tabela 2 – Análise de variância para delineamento com 4 tratamentos, 16 animais e 22 diferentes tempos de amostragem. Pirassununga, 2004

Causa de Variação	Graus de Liberdade
Tratamento	3
Insulação	1
BST	1
Interação	1
Bloco	3
Resíduo A	9
Parcela	15
Tempo	21
Tempo * Tratamento	63
Tempo * Bloco	63
Resíduo B	189
Sub-parcela	351

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados de cada diferente variável estudada e pertinente aos animais serão apresentados em forma de tabelas. Cada tabela contém as informações sobre as 22 semanas do período experimental.

As semanas aparecerão sombreadas nas tabelas para facilitar a visualização dos resultados e relembrar o leitor a respeito da subdivisão do experimento em quatro diferentes fases (Fase Pré-insulação: semanas 1 a 5; Fase Pré-tratamento: semanas 6 a 9, Fase Tratamento: semanas 10 a 17 e Fase Pós-tratamento: semanas 18 a 22).

São apresentados nas tabelas as médias e os erros-padrão semanais para cada variável estudada nos grupos CONT (n=4), bST (n=4), INSUL (n=4) e IbST (n=4) ou independentemente do grupo (n=16). A média e o erro-padrão de cada grupo ao final das 22 semanas também estão representados na última linha de cada coluna.

As probabilidades de haver efeito de insulação, efeito de somatotropina ou efeito da interação de ambos fatores a cada semana encontram-se expressas no lado direito das tabelas.

Caso o resultado tenha efeito estatístico significativo e/ou relevância biológica, o mesmo será também apresentado em formato gráfico, a fim de proporcionar uma visão rápida do comportamento do fenômeno, ressaltando fatos que poderiam passar despercebidos em dados apenas tabulados.

5.1 DADOS CLIMÁTICOS

Durante o período compreendido pelo trabalho, a **temperatura ambiental** máxima alcançada foi de 34,4°C, a menor temperatura registrada foi de 13,7°C e a temperatura média foi de 22,7 °C. O perfil diário de temperaturas máxima, média e mínima pode ser observado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Temperaturas ambientais máxima, média e mínima (°C) durante o período de 14/11/2003 a 16/04/2004 - Pirassununga-SP, 2004

A **umidade relativa** média durante o período foi de 77,1%, tendo variado entre a máxima de 93,6% e mínima de 60,9%. O perfil diário de umidade relativa do ar está expresso no gráfico 2.

Tanto os dados de temperatura quanto de umidade são apresentados para dar ao leitor uma idéia das condições ambientais durante o período experimental, sem, portanto, terem o intuito de pressupor uma análise matemática mais detalhada dessas informações.

Gráfico 2 - Umidade relativa do ar (%) durante o período de 14/11/2003 a 16/04/2004 - Pirassununga-SP, 2004

5.2 TEMPERATURA RETAL E TEMPERATURA DA SUPERFÍCIE ESCROTAL

A **temperatura retal** dos animais está apresentada na tabela 3. A faixa de variação durante as semanas do experimento foi de $38,25 \pm 0,48^{\circ}\text{C}$ a $39,00 \pm 0,00^{\circ}\text{C}$ para o grupo CONT, de $38,35 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ a $39,15 \pm 0,27^{\circ}\text{C}$ para o grupo bST, $38,30 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ a $39,38 \pm 0,33^{\circ}\text{C}$ para o grupo INSUL e $38,25 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ a $39,25 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ para o grupo lbST. A média durante o experimento foi de $38,53 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ (CONT), $38,69 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ (bST), $38,89 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ (INSUL) e $38,65 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ (lbST). Houve efeito significativo do tempo sobre a temperatura retal dos animais ($P=0,0001$), porém nenhum efeito significativo foi obtido nas interações tempo X insulação, tempo X somatotropina ou tempo X insulação X somatotropina.

Já a **temperatura da superfície escrotal** variou de $32,98 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$ a $35,53 \pm 0,40^{\circ}\text{C}$ para o grupo CONT, de $32,83 \pm 0,54^{\circ}\text{C}$ a $35,50 \pm 0,74^{\circ}\text{C}$ para o grupo bST, de $32,83 \pm 0,36^{\circ}\text{C}$ a $35,68 \pm 0,27^{\circ}\text{C}$ para o grupo INSUL e de $32,80 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$ a $35,93 \pm 0,97^{\circ}\text{C}$ para o grupo lbST durante as 22 semanas experimentais. A temperatura escrotal média durante o experimento foi de $34,58 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$ (CONT), $34,58 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ (bST), $34,69 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$ (INSUL) e $34,53 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ (lbST). Houve efeito significativo do tempo ($P=0,0001$) sobre a temperatura da superfície escrotal dos animais, mas nenhum efeito significativo foi obtido nas interações entre tempo e tratamentos. A temperatura escrotal dos animais está apresentada na tabela 4.

Importante notar que a temperatura média da superfície escrotal dos animais insulados foi aferida às 24, 48, 72 e 96 horas de insulação e alcançou respectivamente $35,99 \pm 0,47^{\circ}\text{C}$, de $33,81 \pm 0,54^{\circ}\text{C}$, de $36,43 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$ e de $35,64 \pm 0,51^{\circ}\text{C}$ (dados não expressos em tabela). Durante o período de insulação testicular,

a temperatura ambiente média diária foi de 24,5 °C, 22,3°C, 22,5 °C e 22,7°C às 24, 48, 72 e 96 horas de insulação, respectivamente.

Tabela 3 – Temperatura retal média em °C ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	39,00 $\pm$ 0,00	39,00 $\pm$ 0,00	39,00 $\pm$ 0,00	39,25 $\pm$ 0,25	39,06 $\pm$ 0,06	0,3173	0,3173	0,3434
2	38,50 $\pm$ 0,29	38,50 $\pm$ 0,29	39,00 $\pm$ 0,00	38,25 $\pm$ 0,25	38,56 $\pm$ 0,13	0,5633	0,1054	0,1054
3	38,25 $\pm$ 0,48	38,50 $\pm$ 0,29	38,75 $\pm$ 0,25	38,75 $\pm$ 0,25	38,56 $\pm$ 0,16	0,2932	0,7184	0,7184
4	38,58 $\pm$ 0,25	38,55 $\pm$ 0,16	38,30 $\pm$ 0,21	38,73 $\pm$ 0,30	38,54 $\pm$ 0,11	0,8223	0,3790	0,3251
5	38,88 $\pm$ 0,17	38,80 $\pm$ 0,14	39,10 $\pm$ 0,08	38,85 $\pm$ 0,12	38,91 $\pm$ 0,06	0,3129	0,2382	0,5135
6	38,45 $\pm$ 0,09	38,63 $\pm$ 0,09	38,70 $\pm$ 0,07	38,83 $\pm$ 0,17	38,65 $\pm$ 0,06	0,0212	0,0963	0,7640
7	38,43 $\pm$ 0,06	38,58 $\pm$ 0,19	38,48 $\pm$ 0,22	38,60 $\pm$ 0,25	38,52 $\pm$ 0,09	0,8593	0,5203	0,9528
8	38,68 $\pm$ 0,05	38,53 $\pm$ 0,10	38,85 $\pm$ 0,10	38,63 $\pm$ 0,15	38,67 $\pm$ 0,06	0,2909	0,1604	0,7666
9	38,53 $\pm$ 0,14	38,60 $\pm$ 0,16	38,98 $\pm$ 0,15	38,58 $\pm$ 0,15	38,67 $\pm$ 0,08	0,1470	0,2558	0,1099
10	38,60 $\pm$ 0,29	38,60 $\pm$ 0,13	38,88 $\pm$ 0,03	38,60 $\pm$ 0,16	38,67 $\pm$ 0,08	0,4902	0,4902	0,4902
11	38,53 $\pm$ 0,20	38,90 $\pm$ 0,23	38,88 $\pm$ 0,09	38,68 $\pm$ 0,09	38,74 $\pm$ 0,08	0,4596	0,5973	0,0531
12	38,28 $\pm$ 0,08	38,68 $\pm$ 0,09	38,88 $\pm$ 0,14	38,50 $\pm$ 0,07	38,58 $\pm$ 0,07	0,0582	0,9013	0,0033
13	38,40 $\pm$ 0,20	38,63 $\pm$ 0,22	38,75 $\pm$ 0,13	38,45 $\pm$ 0,25	38,56 $\pm$ 0,10	0,5706	0,8065	0,1113
14	38,48 $\pm$ 0,26	38,73 $\pm$ 0,23	39,10 $\pm$ 0,31	38,35 $\pm$ 0,24	38,66 $\pm$ 0,14	0,6322	0,3477	0,0789
15	38,35 $\pm$ 0,21	38,65 $\pm$ 0,24	38,58 $\pm$ 0,09	38,38 $\pm$ 0,19	38,49 $\pm$ 0,09	0,8742	0,8328	0,1941
16	38,60 $\pm$ 0,18	39,15 $\pm$ 0,27	39,15 $\pm$ 0,17	38,75 $\pm$ 0,15	38,91 $\pm$ 0,11	0,7161	0,7161	0,0414
17	38,80 $\pm$ 0,07	38,88 $\pm$ 0,16	39,38 $\pm$ 0,33	39,00 $\pm$ 0,20	39,01 $\pm$ 0,11	0,0698	0,4010	0,2187
18	38,53 $\pm$ 0,08	38,75 $\pm$ 0,21	39,10 $\pm$ 0,14	38,90 $\pm$ 0,17	38,82 $\pm$ 0,09	0,0288	0,9306	0,1620
19	38,33 $\pm$ 0,14	38,35 $\pm$ 0,05	38,75 $\pm$ 0,23	38,45 $\pm$ 0,09	38,47 $\pm$ 0,08	0,0906	0,3468	0,2708
20	38,53 $\pm$ 0,17	38,80 $\pm$ 0,29	39,15 $\pm$ 0,18	38,50 $\pm$ 0,24	38,74 $\pm$ 0,12	0,3861	0,3206	0,0291
21	38,43 $\pm$ 0,16	38,88 $\pm$ 0,36	39,13 $\pm$ 0,36	38,80 $\pm$ 0,30	38,81 $\pm$ 0,15	0,1540	0,7626	0,0856
22	38,50 $\pm$ 0,19	38,53 $\pm$ 0,19	38,83 $\pm$ 0,15	38,45 $\pm$ 0,22	38,58 $\pm$ 0,09	0,4119	0,2591	0,2019
Média	38,53 $\pm$ 0,04	38,69 $\pm$ 0,04	38,89 $\pm$ 0,04	38,65 $\pm$ 0,05	38,69 $\pm$ 0,02	0,1184	0,6657	0,0578

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,9326

Tempo X bST = 0,4430

Tempo X Insulação X bST = 0,0820

Tabela 4 – Temperatura escrotal média em °C (± EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	IbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	34,58 ± 0,45	34,48 ± 0,13	35,08 ± 0,25	34,95 ± 0,32	34,77 ± 0,15	0,0505	0,6152	0,9551
2	34,25 ± 0,03	34,35 ± 0,53	35,68 ± 0,27	34,13 ± 0,43	34,35 ± 0,17	0,8117	0,5944	0,4457
3	34,85 ± 0,05	34,58 ± 0,18	34,33 ± 0,13	34,40 ± 0,17	34,54 ± 0,08	0,0396	0,5093	0,2599
4	34,80 ± 0,18	34,25 ± 0,62	34,73 ± 0,46	34,70 ± 0,69	34,62 ± 0,24	0,6237	0,4561	0,4950
5	35,38 ± 0,21	34,93 ± 0,47	34,70 ± 0,50	34,50 ± 0,83	34,88 ± 0,26	0,3353	0,5624	0,8222
6	34,15 ± 0,39	34,38 ± 0,23	34,33 ± 0,37	34,10 ± 0,29	34,24 ± 0,15	0,8841	1,0000	0,5168
7	35,15 ± 0,52	34,70 ± 0,51	35,50 ± 0,12	34,83 ± 0,45	35,04 ± 0,21	0,4617	0,1020	0,7241
8	34,78 ± 0,19	34,85 ± 0,38	35,10 ± 0,50	34,85 ± 0,43	34,89 ± 0,18	0,7263	0,8501	0,7263
9	34,45 ± 0,19	34,75 ± 0,35	34,40 ± 0,18	33,83 ± 0,08	34,36 ± 0,13	0,0418	0,5203	0,0622
10	35,53 ± 0,40	34,43 ± 0,74	35,13 ± 0,59	35,28 ± 0,78	35,09 ± 0,31	0,6320	0,3226	0,2018
11	35,15 ± 0,62	35,25 ± 0,66	35,43 ± 0,58	35,93 ± 0,97	35,44 ± 0,33	0,4668	0,6427	0,7563
12	34,40 ± 0,25	35,50 ± 0,74	35,20 ± 0,72	34,18 ± 0,68	34,82 ± 0,32	0,6830	0,9533	0,1219
13	34,88 ± 0,12	34,98 ± 0,65	35,35 ± 0,15	34,90 ± 0,66	35,03 ± 0,22	0,4936	0,1403	0,5817
14	34,83 ± 0,09	35,15 ± 0,63	35,13 ± 0,50	34,73 ± 0,53	34,96 ± 0,22	0,8819	0,9289	0,3985
15	34,73 ± 0,35	35,18 ± 0,44	34,68 ± 0,15	35,35 ± 0,42	34,98 ± 0,18	0,8720	0,1700	0,7723
16	34,95 ± 0,13	35,13 ± 0,32	34,93 ± 0,17	35,43 ± 0,48	35,11 ± 0,15	0,7033	0,3596	0,6531
17	35,45 ± 0,32	35,23 ± 0,52	35,60 ± 0,46	35,73 ± 0,33	35,50 ± 0,19	0,3138	0,8732	0,5797
18	35,30 ± 0,23	35,05 ± 0,03	35,03 ± 0,03	35,15 ± 0,09	35,13 ± 0,06	0,5374	0,6579	0,2028
19	33,55 ± 0,66	33,63 ± 0,31	33,88 ± 0,17	33,25 ± 0,55	33,58 ± 0,22	0,9543	0,5327	0,4304
20	32,98 ± 0,32	33,65 ± 0,34	33,85 ± 0,21	33,40 ± 0,28	33,47 ± 0,15	0,2519	0,6698	0,0550
21	33,33 ± 0,08	33,48 ± 0,28	33,28 ± 0,32	33,28 ± 0,25	33,34 ± 0,11	0,5358	0,7083	0,7083
22	33,25 ± 0,40	32,83 ± 0,54	32,83 ± 0,36	32,80 ± 0,31	32,93 ± 0,19	0,3410	0,2900	0,6814
Média	34,58 ± 0,10	34,58 ± 0,11	34,69 ± 0,10	34,53 ± 0,13	34,60 ± 0,06	0,8660	0,6757	0,6713

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, IbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,8870

Tempo X bST = 0,9573

Tempo X Insulação X bST = 0,4397

5.3 CONSISTÊNCIA TESTICULAR E PERÍMETRO ESCROTAL

A **consistência testicular** dos animais está apresentada na tabela 5. A consistência média dos grupos durante o transcorrer do experimento foi de $2,38 \pm 0,04$, de $2,62 \pm 0,05$, de $2,61 \pm 0,03$ e de $2,27 \pm 0,04$ para os grupos CONT, bST, INSUL e lbST, respectivamente. Houve efeito significativo do tempo sobre os resultados ($P=0,0002$), mas não houve efeito importante das interações entre tempo X insulação, tempo X somatotropina ou tempo X insulação X somatotropina.

O **perímetro escrotal** médio em centímetros dos animais pertencentes aos diferentes grupos foi de $41,93 \pm 0,16$ (CONT), de $40,19 \pm 0,10$ (bST), de $40,58 \pm 0,21$ (INSUL) e de $38,91 \pm 0,16$ (lbST). Houve efeito estatístico significativo de tempo ($P=0,0001$) e efeito de interação entre tempo e insulação testicular sobre o perímetro escrotal ($P=0,0001$). Os animais que foram insulados (INSUL ou lbST) apresentaram drástica redução do perímetro escrotal a partir da sexta semana de experimento, a qual corresponde à primeira semana após o final da insulação testicular. Houve efeito significativo da insulação testicular com conseqüente diferença entre o perímetro escrotal dos animais insulados e dos não insulados durante as semanas 8 ($P<0,05$), 9, 10, 11, 12 e 13 ($P<0,01$), com desvantagem para os animais insulados.

Após a semana 11 os animais insulados (grupos INSUL e lbST) apresentaram um aumento de seus perímetros escrotais, porém os valores médios aferidos durante a fase pós-tratamento nesses animais (semanas 17 a 22) em nenhum momento alcançaram os valores que os mesmos apresentavam imediatamente antes da insulação (semana 5). Não houve efeito de interação entre tempo X somatotropina nem entre tempo X insulação x somatotropina sobre o perímetro

escrotal. O acompanhamento das mensurações do perímetro escrotal dos touros dos diferentes grupos pode ser constatado na tabela 6, cujos dados principais figuram no gráfico 3.

Tabela 5 – Consistência testicular média em escala de 1 a 5 ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	2,63 $\pm$ 0,13	2,75 $\pm$ 0,14	3,13 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 0,09	0,4427	0,1208	0,0277
2	2,38 $\pm$ 0,13	2,50 $\pm$ 0,20	2,50 $\pm$ 0,00	2,63 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,08	0,4805	0,5441	0,9591
3	2,25 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 0,00	2,50 $\pm$ 0,00	2,38 $\pm$ 0,13	2,41 $\pm$ 0,05	0,5633	0,5633	0,1054
4	2,50 $\pm$ 0,00	2,63 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,13	2,53 $\pm$ 0,06	0,4516	0,4516	0,0601
5	2,38 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,20	2,38 $\pm$ 0,13	2,47 $\pm$ 0,09	0,7033	0,7033	0,2684
6	2,25 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 0,20	2,38 $\pm$ 0,13	1,75 $\pm$ 0,14	2,22 $\pm$ 0,10	0,0865	0,2303	0,0261
7	2,50 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,13	2,25 $\pm$ 0,14	2,56 $\pm$ 0,09	0,1434	0,9538	0,0342
8	2,38 $\pm$ 0,24	2,75 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,14	2,13 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,12	0,5972	0,5480	0,0565
9	2,63 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,20	2,63 $\pm$ 0,13	2,00 $\pm$ 0,00	2,44 $\pm$ 0,10	0,1751	0,0501	0,1492
10	2,50 $\pm$ 0,20	2,63 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,13	2,25 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 0,09	0,5117	0,4505	0,1751
11	2,50 $\pm$ 0,00	2,63 $\pm$ 0,24	2,25 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 0,20	2,34 $\pm$ 0,11	0,0240	0,6249	0,3128
12	2,25 $\pm$ 0,14	2,63 $\pm$ 0,24	2,38 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,13	2,41 $\pm$ 0,08	0,5785	0,0601	0,0601
13	2,38 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,20	2,13 $\pm$ 0,24	2,41 $\pm$ 0,10	0,3002	0,6463	0,1188
14	2,38 $\pm$ 0,13	2,75 $\pm$ 0,25	2,63 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,24	2,53 $\pm$ 0,10	0,7421	0,8198	0,1051
15	2,25 $\pm$ 0,14	2,63 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,20	2,25 $\pm$ 0,14	2,41 $\pm$ 0,09	0,7548	0,7548	0,1216
16	2,25 $\pm$ 0,14	2,75 $\pm$ 0,25	2,88 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,31	2,56 $\pm$ 0,12	0,4322	0,8806	0,0052
17	2,88 $\pm$ 0,24	2,75 $\pm$ 0,32	2,88 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,24	2,72 $\pm$ 0,12	0,2379	0,0421	0,2050
18	2,13 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,20	2,63 $\pm$ 0,13	2,00 $\pm$ 0,20	2,31 $\pm$ 0,11	1,0000	0,4205	0,0077
19	2,25 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 0,35	2,63 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,31	2,44 $\pm$ 0,12	0,4757	0,8190	0,1982
20	2,13 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,35	2,50 $\pm$ 0,20	2,38 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,12	0,4779	0,5938	0,3141
21	2,38 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,38	2,63 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,13	2,50 $\pm$ 0,11	0,8411	0,9134	0,2582
22	2,25 $\pm$ 0,32	2,50 $\pm$ 0,35	2,75 $\pm$ 0,14	2,25 $\pm$ 0,14	2,44 $\pm$ 0,13	0,5464	0,6509	0,1939
Média	2,38 $\pm$ 0,04	2,62 $\pm$ 0,05	2,61 $\pm$ 0,03	2,27 $\pm$ 0,04	2,47 $\pm$ 0,02	0,5256	0,4997	0,0101

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0002

Tempo X Insulação = 0,1495

Tempo X bST = 0,5512

Tempo X Insulação X bST = 0,7209

Tabela 6 – Perímetro escrotal médio em centímetros ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

Tabela 6 – Perímetro escrotal médio em centímetros ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	40,63 $\pm$ 0,77	38,75 $\pm$ 0,43	40,25 $\pm$ 0,97	39,15 $\pm$ 0,38	39,69 $\pm$ 0,36	0,9871	0,0788	0,6181
2	42,23 $\pm$ 0,82	39,60 $\pm$ 0,25	41,60 $\pm$ 1,20	38,88 $\pm$ 0,43	40,58 $\pm$ 0,50	0,4199	0,0085	0,9515
3	42,20 $\pm$ 0,45	40,18 $\pm$ 0,48	41,83 $\pm$ 0,98	40,03 $\pm$ 0,70	41,06 $\pm$ 0,40	0,7290	0,0285	0,8816
4	42,50 $\pm$ 0,86	40,20 $\pm$ 0,36	42,05 $\pm$ 1,25	40,15 $\pm$ 0,46	41,23 $\pm$ 0,46	0,7500	0,0221	0,7986
5	42,43 $\pm$ 1,31	40,65 $\pm$ 0,28	42,20 $\pm$ 1,01	40,63 $\pm$ 0,65	41,48 $\pm$ 0,46	0,8981	0,1115	0,9184
6	41,75 $\pm$ 0,94	40,18 $\pm$ 0,56	41,48 $\pm$ 0,85	40,88 $\pm$ 0,55	41,07 $\pm$ 0,37	0,7931	0,2000	0,5507
7	41,53 $\pm$ 0,77	39,80 $\pm$ 0,43	40,38 $\pm$ 1,00	38,53 $\pm$ 0,72	40,06 $\pm$ 0,44	0,1898	0,0661	0,9433
8	41,85 $\pm$ 0,87	40,50 $\pm$ 0,34	40,25 $\pm$ 0,78	38,63 $\pm$ 0,54	40,31 $\pm$ 0,42	0,0366	0,0651	0,8504
9	41,45 $\pm$ 0,61	40,33 $\pm$ 0,51	39,15 $\pm$ 0,39	37,43 $\pm$ 0,91	39,59 $\pm$ 0,48	0,0053	0,0762	0,6832
10	41,78 $\pm$ 0,61	40,13 $\pm$ 0,35	39,10 $\pm$ 0,69	38,20 $\pm$ 0,72	39,80 $\pm$ 0,44	0,0078	0,0916	0,5921
11	42,18 $\pm$ 0,71	40,43 $\pm$ 0,52	39,30 $\pm$ 0,69	37,18 $\pm$ 0,68	39,77 $\pm$ 0,55	0,0025	0,0279	0,8058
12	42,28 $\pm$ 0,86	40,80 $\pm$ 0,28	39,25 $\pm$ 0,86	37,80 $\pm$ 0,73	40,03 $\pm$ 0,54	0,0046	0,1029	0,9880
13	42,53 $\pm$ 0,80	40,40 $\pm$ 0,38	39,60 $\pm$ 1,01	38,18 $\pm$ 0,80	40,18 $\pm$ 0,54	0,0187	0,0800	0,7063
14	41,78 $\pm$ 0,98	40,83 $\pm$ 0,41	40,18 $\pm$ 1,19	38,50 $\pm$ 0,96	40,32 $\pm$ 0,52	0,0866	0,2304	0,7306
15	41,60 $\pm$ 1,09	39,08 $\pm$ 0,41	39,90 $\pm$ 1,49	37,85 $\pm$ 0,55	39,61 $\pm$ 0,56	0,2201	0,0693	0,8353
16	42,00 $\pm$ 0,84	40,10 $\pm$ 0,14	40,55 $\pm$ 1,23	38,68 $\pm$ 0,84	40,33 $\pm$ 0,49	0,1636	0,0776	0,9898
17	42,25 $\pm$ 0,67	40,35 $\pm$ 0,46	41,58 $\pm$ 0,70	38,90 $\pm$ 0,79	40,77 $\pm$ 0,44	0,1954	0,0147	0,6222
18	42,53 $\pm$ 0,82	40,88 $\pm$ 0,61	40,93 $\pm$ 0,80	39,33 $\pm$ 0,40	40,91 $\pm$ 0,42	0,0477	0,0424	0,9718
19	41,80 $\pm$ 0,78	40,03 $\pm$ 0,36	41,23 $\pm$ 0,93	39,25 $\pm$ 0,67	40,58 $\pm$ 0,41	0,4236	0,0448	0,9039
20	41,85 $\pm$ 1,04	41,28 $\pm$ 0,10	41,58 $\pm$ 0,91	39,83 $\pm$ 0,61	41,13 $\pm$ 0,39	0,3025	0,1745	0,4753
21	41,88 $\pm$ 0,53	40,08 $\pm$ 0,31	40,70 $\pm$ 0,84	39,43 $\pm$ 0,77	40,52 $\pm$ 0,37	0,2137	0,0506	0,7092
22	41,40 $\pm$ 0,78	39,55 $\pm$ 0,24	39,68 $\pm$ 0,96	38,58 $\pm$ 0,90	39,80 $\pm$ 0,43	0,1389	0,1098	0,6626
Média	41,93 $\pm$ 0,16	40,19 $\pm$ 0,10	40,58 $\pm$ 0,21	38,91 $\pm$ 0,16	40,40 $\pm$ 0,10	0,0990	0,0405	0,9623

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,5202

Tempo X Insulação X bST = 0,9408

Gráfico 3 – Perímetro escrotal médio de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

5.4 VOLUME, CONCENTRAÇÃO E PH SEMINAL

Como o método de coleta utilizado foi a eletroejaculação, o **volume** mínimo a ser colhido em cada procedimento foi preestabelecido em 9 mL. Dada a possibilidade da coleta de um volume arbitrariamente definido, os dados desta característica não aparecem expressos em tabela ou gráfico. A título de informação, os volumes das coletas durante todo período experimental variaram entre 9,0 e 15,0 mL e todas as amostras foram colhidas com sucesso.

A **concentração espermática** média foi de $182,97 \pm 19,35$, de $218,08 \pm 21,36$, de $216,52 \pm 20,47$ e de $136,87 \pm 15,73$ espermatozóides por mL de sêmen para os animais dos grupos CONT, bST, INSUL e IbST, respectivamente. Houve efeito significativo do tempo sobre os resultados ($P=0,0001$), mas não houve efeito das interações entre tempo X insulação, tempo X somatotropina ou tempo X insulação X somatotropina. Destaque para a diminuição na concentração espermática apresentada pelos animais dos grupos insulados (INSUL e IbST) imediatamente após a insulação e que se estendeu da semana 6 à semana 10.

A semana 10 foi o momento ao longo do experimento em que os animais apresentaram os menores valores de espermatozóides por mL de sêmen ($61,25 \pm 13,17$ para o grupo CONT, $83,13 \pm 38,30$ para o grupo bST, $11,25 \pm 3,61$ para o grupo INSUL e $3,25 \pm 1,09$ para o grupo IbST). Nesta semana, a concentração espermática dos animais insulados foi significativamente menor que a dos animais não insulados ($P<0,05$). Os dados referentes à concentração média dos ejaculados ao longo das 22 semanas podem ser observados na tabela 7.

O **pH** dos ejaculados variou de $6,30 \pm 0,33$ a $7,43 \pm 0,10$ no grupo CONT, de $6,58 \pm 0,10$ a $7,31 \pm 0,27$ no grupo bST, de $6,24 \pm 0,26$ a $7,64 \pm 0,29$ no grupo INSUL e de $6,74 \pm 0,40$ a $7,35 \pm 0,30$ no grupo lbST durante as semanas do experimento. Houve efeitos do tempo nos resultados ($P=0,0007$) e da interação entre tempo X insulação ($P=0,0317$). Os valores do pH médio de cada tratamento podem ser observados na tabela 8.

Tabela 7 – Concentração espermática média em milhões de espermatozóides/mL ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	285,00 $\pm$ 46,92	333,75 $\pm$ 140,78	186,25 $\pm$ 23,42	265,00 $\pm$ 87,58	267,50 $\pm$ 41,23	0,3588	0,4804	0,8663
2	187,50 $\pm$ 53,02	325,63 $\pm$ 115,81	532,50 $\pm$ 132,50	274,38 $\pm$ 63,92	330,00 $\pm$ 54,47	0,2053	0,5906	0,0986
3	113,75 $\pm$ 39,00	192,50 $\pm$ 84,92	271,25 $\pm$ 53,84	275,63 $\pm$ 103,71	213,28 $\pm$ 37,58	0,0805	0,5136	0,5579
4	179,38 $\pm$ 35,05	361,88 $\pm$ 207,13	242,50 $\pm$ 59,64	198,63 $\pm$ 58,07	245,59 $\pm$ 53,74	0,6658	0,5518	0,3392
5	429,38 $\pm$ 208,53	253,75 $\pm$ 57,68	433,13 $\pm$ 109,98	175,00 $\pm$ 42,66	322,81 $\pm$ 62,23	0,7860	0,1401	0,7653
6	250,00 $\pm$ 105,78	210,63 $\pm$ 71,68	453,75 $\pm$ 114,67	319,38 $\pm$ 103,14	308,44 $\pm$ 50,75	0,0148	0,1287	0,3843
7	306,88 $\pm$ 123,71	227,00 $\pm$ 45,31	270,63 $\pm$ 95,22	193,13 $\pm$ 88,95	249,41 $\pm$ 42,90	0,6600	0,3340	0,9880
8	259,38 $\pm$ 42,47	236,25 $\pm$ 39,06	133,13 $\pm$ 43,93	78,75 $\pm$ 38,60	176,88 $\pm$ 26,50	0,0024	0,2850	0,6576
9	185,00 $\pm$ 46,67	331,88 $\pm$ 223,19	116,88 $\pm$ 72,78	17,50 $\pm$ 10,36	162,81 $\pm$ 61,17	0,1536	0,8509	0,3420
10	61,25 $\pm$ 13,17	83,13 $\pm$ 38,30	11,25 $\pm$ 3,61	3,25 $\pm$ 1,09	39,72 $\pm$ 12,55	0,0148	0,7555	0,5069
11	133,13 $\pm$ 52,14	220,63 $\pm$ 33,17	86,88 $\pm$ 51,75	81,90 $\pm$ 54,24	130,63 $\pm$ 26,05	0,0732	0,3893	0,3373
12	75,18 $\pm$ 29,92	146,25 $\pm$ 46,80	47,30 $\pm$ 46,73	40,63 $\pm$ 21,42	77,34 $\pm$ 20,08	0,1365	0,4506	0,3659
13	120,63 $\pm$ 35,87	68,13 $\pm$ 27,98	33,75 $\pm$ 26,78	66,25 $\pm$ 33,06	72,19 $\pm$ 16,08	0,1853	0,7539	0,2028
14	97,75 $\pm$ 32,11	179,38 $\pm$ 36,33	139,38 $\pm$ 55,66	86,25 $\pm$ 34,41	125,69 $\pm$ 20,54	0,4942	0,7128	0,1663
15	164,38 $\pm$ 71,82	230,63 $\pm$ 95,45	116,88 $\pm$ 44,83	15,00 $\pm$ 10,94	131,72 $\pm$ 35,09	0,1020	0,8108	0,2746
16	135,63 $\pm$ 63,37	370,00 $\pm$ 49,51	350,63 $\pm$ 130,35	68,75 $\pm$ 28,07	231,25 $\pm$ 48,61	0,6280	0,7886	0,0149
17	129,38 $\pm$ 27,66	164,38 $\pm$ 70,68	270,00 $\pm$ 118,05	77,50 $\pm$ 33,45	160,31 $\pm$ 37,04	0,7192	0,3052	0,1508
18	390,63 $\pm$ 242,81	81,25 $\pm$ 50,72	346,88 $\pm$ 102,27	177,50 $\pm$ 109,91	249,06 $\pm$ 72,47	0,8670	0,1505	0,6567
19	133,13 $\pm$ 62,18	350,80 $\pm$ 187,14	120,25 $\pm$ 26,03	197,33 $\pm$ 76,11	200,38 $\pm$ 53,17	0,4416	0,1876	0,5134
20	103,75 $\pm$ 42,90	221,88 $\pm$ 111,15	136,88 $\pm$ 30,79	26,88 $\pm$ 9,21	122,34 $\pm$ 32,98	0,2720	0,9545	0,1336
21	111,25 $\pm$ 39,38	108,75 $\pm$ 59,73	207,13 $\pm$ 40,95	152,50 $\pm$ 93,56	144,91 $\pm$ 29,72	0,2742	0,6452	0,6740
22	173,13 $\pm$ 82,68	99,38 $\pm$ 57,44	256,25 $\pm$ 78,49	220,00 $\pm$ 95,50	187,19 $\pm$ 38,73	0,2211	0,4958	0,8142
Média	182,97 $\pm$ 19,35	218,08 $\pm$ 21,36	216,52 $\pm$ 20,47	136,87 $\pm$ 15,73	188,61 $\pm$ 9,79	0,4822	0,5107	0,1115

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,1277

Tempo X bST = 0,2448

Tempo X Insulação X bST = 0,518

Tabela 8 – Valor do pH médio ($\pm$ EPM) do sêmen de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	6,77 $\pm$ 0,09	6,96 $\pm$ 0,13	7,10 $\pm$ 0,16	7,14 $\pm$ 0,28	6,99 $\pm$ 0,09	0,1237	0,4692	0,6320
2	7,25 $\pm$ 0,23	6,99 $\pm$ 0,16	6,73 $\pm$ 0,09	6,87 $\pm$ 0,20	6,96 $\pm$ 0,09	0,1089	0,7342	0,2914
3	7,43 $\pm$ 0,10	7,05 $\pm$ 0,21	6,90 $\pm$ 0,15	6,84 $\pm$ 0,14	7,05 $\pm$ 0,09	0,0324	0,1767	0,3089
4	7,14 $\pm$ 0,22	6,84 $\pm$ 0,14	7,01 $\pm$ 0,24	6,92 $\pm$ 0,21	6,98 $\pm$ 0,10	0,9230	0,3253	0,5870
5	6,83 $\pm$ 0,17	6,91 $\pm$ 0,12	6,80 $\pm$ 0,13	6,86 $\pm$ 0,09	6,85 $\pm$ 0,06	0,6858	0,5037	0,8923
6	6,80 $\pm$ 0,18	6,90 $\pm$ 0,15	6,82 $\pm$ 0,05	6,87 $\pm$ 0,24	6,85 $\pm$ 0,08	0,9164	0,6744	0,8642
7	6,77 $\pm$ 0,39	6,71 $\pm$ 0,06	6,98 $\pm$ 0,10	6,89 $\pm$ 0,09	6,84 $\pm$ 0,10	0,3652	0,7371	0,9388
8	6,70 $\pm$ 0,21	6,66 $\pm$ 0,10	7,05 $\pm$ 0,07	6,86 $\pm$ 0,05	6,81 $\pm$ 0,07	0,0620	0,3850	0,5766
9	6,80 $\pm$ 0,18	6,81 $\pm$ 0,16	7,02 $\pm$ 0,09	7,06 $\pm$ 0,08	6,92 $\pm$ 0,07	0,1477	0,8910	0,9293
10	7,10 $\pm$ 0,21	7,31 $\pm$ 0,27	7,64 $\pm$ 0,29	7,31 $\pm$ 0,12	7,34 $\pm$ 0,11	0,3038	0,8139	0,3123
11	6,94 $\pm$ 0,22	6,59 $\pm$ 0,07	7,29 $\pm$ 0,27	7,21 $\pm$ 0,36	7,01 $\pm$ 0,13	0,0872	0,4170	0,6127
12	7,10 $\pm$ 0,18	6,70 $\pm$ 0,14	7,48 $\pm$ 0,29	7,13 $\pm$ 0,14	7,10 $\pm$ 0,11	0,0826	0,1060	0,9302
13	6,81 $\pm$ 0,10	7,15 $\pm$ 0,24	7,42 $\pm$ 0,39	7,07 $\pm$ 0,19	7,11 $\pm$ 0,13	0,3183	0,9725	0,2009
14	7,12 $\pm$ 0,22	6,66 $\pm$ 0,19	7,18 $\pm$ 0,40	6,82 $\pm$ 0,15	6,94 $\pm$ 0,13	0,6912	0,1652	0,8633
15	6,97 $\pm$ 0,16	6,80 $\pm$ 0,29	7,08 $\pm$ 0,30	7,35 $\pm$ 0,30	7,05 $\pm$ 0,13	0,2819	0,8737	0,4732
16	7,03 $\pm$ 0,14	6,58 $\pm$ 0,10	6,56 $\pm$ 0,26	6,97 $\pm$ 0,11	6,79 $\pm$ 0,90	0,8129	0,9057	0,0459
17	6,98 $\pm$ 0,14	6,89 $\pm$ 0,25	6,89 $\pm$ 0,31	7,16 $\pm$ 0,33	6,98 $\pm$ 0,12	0,7481	0,7614	0,5272
18	6,30 $\pm$ 0,33	7,29 $\pm$ 0,30	6,86 $\pm$ 0,40	6,84 $\pm$ 0,18	6,82 $\pm$ 0,17	0,8643	0,1462	0,1338
19	6,71 $\pm$ 0,09	6,63 $\pm$ 0,18	6,96 $\pm$ 0,22	6,87 $\pm$ 0,22	6,79 $\pm$ 0,09	0,2613	0,6847	0,9721
20	7,10 $\pm$ 0,16	6,81 $\pm$ 0,24	6,70 $\pm$ 0,21	7,34 $\pm$ 0,13	6,99 $\pm$ 0,11	0,7614	0,4092	0,0488
21	6,94 $\pm$ 0,10	6,98 $\pm$ 0,20	6,91 $\pm$ 0,21	6,98 $\pm$ 0,33	6,95 $\pm$ 0,10	0,9654	0,8362	0,9578
22	6,90 $\pm$ 0,27	6,85 $\pm$ 0,21	6,24 $\pm$ 0,26	6,74 $\pm$ 0,40	6,68 $\pm$ 0,15	0,1719	0,4114	0,3102
Média	6,93 $\pm$ 0,04	6,87 $\pm$ 0,04	6,98 $\pm$ 0,06	7,00 $\pm$ 0,05	6,94 $\pm$ 0,02	0,4704	0,8647	0,7450

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0007

Tempo X Insulação = 0,0317

Tempo X bST = 0,2654

Tempo X Insulação X bST = 0,0633

5.5 MOTILIDADE, VIGOR ESPERMÁTICO E MOVIMENTO DE MASSA

Conforme pode ser notado na tabela 9 e no gráfico 4, os 16 touros iniciaram o experimento com níveis de **motilidade espermática** bastante homogêneos, de modo que a motilidade média à primeira coleta foi de 65,00%, de 68,75%, de 73,75% e de 72,50% para os animais dos grupos CONT, bST, INSUL e IbST, respectivamente. Imediatamente antes do início da insulação testicular (portanto, à quinta semana de coleta), os animais apresentavam motilidade espermática média de $71,25 \pm 2,39\%$ no grupo CONT, de $72,50 \pm 2,50\%$ no grupo bST, de $72,50 \pm 2,50\%$ no grupo INSUL e de $72,50 \pm 1,44\%$ no grupo IbST.

A motilidade espermática apresentada pelos touros foi influenciada pelo tempo ($P=0,0001$) e houve efeito significativo entre tempo X insulação ($P=0,0001$). A motilidade espermática dos animais dos grupos INSUL e IbST decaiu imediatamente após o início da insulação testicular, com notáveis declínios consecutivos entre as semanas 6 a 9. Durante o período compreendido entre as semanas 6 e 13 houve efeito significativo da insulação sobre os resultados, de modo que as médias de motilidade para os grupos insulados (INSUL e IbST) foram significativamente inferiores às médias dos grupos CONT e bST em todo este período.

Já a motilidade dos animais dos grupos CONT e bST se mantiveram relativamente estáveis ao longo de todo período experimental. Durante as 22 semanas do período experimental a motilidade variou no grupo CONT entre $58,75 \pm 9,66\%$ e $71,25 \pm 2,39\%$, no grupo bST entre $52,50 \pm 12,99\%$ e $72,50 \pm 2,50\%$, enquanto no grupo INSUL a motilidade variou entre $15,00 \pm 13,39\%$ e $73,75 \pm 1,25\%$ e no grupo IbST entre $13,75 \pm 8,98\%$ e $72,50 \pm 2,50\%$.

Os animais do grupo INSUL apresentaram o menor índice de motilidade (15,00%) na semana 9 e os animais do grupo IbST apresentaram o menor índice de motilidade (13,75%) na semana 10.

Quanto ao **vigor** apresentado pelos espermatozóides, houve efeito do tempo ($P=0,0001$), bem como houve efeito significativo entre tempo X insulação ($P=0,0001$) para esta variável. A média de vigor espermático ao longo do período experimental foi de $2,86 \pm 0,05$ no grupo CONT, de $2,77 \pm 0,06$ no grupo bST, de $2,36 \pm 0,10$ no grupo INSUL e de $2,18 \pm 0,10$ no grupo IbST, conforme apresentados na tabela 10 e no gráfico 5.

Houve decréscimo consecutivo no vigor médio dos espermatozóides dos touros insulados (grupos INSUL e IbST) durante o período compreendido entre as semanas 6 a 9, de modo que o vigor médio mínimo no grupo INSUL foi registrado na semana 9 ($0,75 \pm 0,48$) e o vigor médio mínimo no grupo IbST ocorreu na semana 10 ($1,00 \pm 0,41$). Os mínimos valores apresentados pelos grupos CONT e bST foram respectivamente de $2,50 \pm 0,35$ (semana 3) e de $2,50 \pm 0,54$ (semana 22). Entre as semanas 6 e 15, o vigor espermático dos touros insulados (INSUL e IbST) foi sempre significativamente menor que os valores alcançados pelos touros não insulados (CONT e bST), com destaque para as semanas 7, 8, 9 e 10, quando a diferença estatística foi altamente significativa.

Quanto aos resultados de **movimento de massa (turbilhonamento)**, não havia diferença significativa entre os grupos ao longo de quatro semanas que precederam a insulação testicular. Após a insulação, os animais dos grupos INSUL e IbST apresentaram progressiva diminuição no turbilhonamento, notável entre as semanas 6 e 10.

Entre as semanas 7 e 11 os animais do grupo INSUL e IbST apresentaram turbilhonamento significativamente menor que os animais dos grupos CONT e bST, com efeito expresso da insulação ($P < 0,005$). Durante a semana 10, foram registrados os valores mínimos de movimento de massa tanto para o grupo INSUL ($0,50 \pm 0,29$) quanto para o grupo IbST (0,00). Houve efeito de tempo ($P = 0,0001$), de interação tempo X insulação ($P = 0,0001$) e de interação tempo X bST (0,0386) para a variável turbilhonamento. Os resultados de turbilhonamento ao longo das 22 semanas estão expressos na tabela 11 e no gráfico 6.

Tabela 9 – Motilidade espermática média em porcentagem ($\pm$ EPM) do sêmen de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	65,00 $\pm$ 2,89	68,75 $\pm$ 2,39	73,75 $\pm$ 1,25	72,50 $\pm$ 2,50	70,00 $\pm$ 1,37	0,0229	0,5972	0,3018
2	58,75 $\pm$ 9,66	71,25 $\pm$ 2,39	73,75 $\pm$ 1,25	72,50 $\pm$ 1,44	69,06 $\pm$ 2,75	0,1341	0,2837	0,1970
3	58,75 $\pm$ 5,91	68,75 $\pm$ 3,75	73,75 $\pm$ 1,25	72,50 $\pm$ 1,44	68,44 $\pm$ 2,22	0,0150	0,1950	0,1054
4	66,25 $\pm$ 3,75	66,25 $\pm$ 5,91	71,25 $\pm$ 1,25	70,00 $\pm$ 2,04	68,44 $\pm$ 1,75	0,2022	0,8486	0,8486
5	71,25 $\pm$ 2,39	72,50 $\pm$ 2,50	72,50 $\pm$ 2,50	72,50 $\pm$ 1,44	72,19 $\pm$ 1,02	0,7676	0,7676	0,7676
6	68,75 $\pm$ 2,39	66,25 $\pm$ 4,27	56,25 $\pm$ 5,54	62,50 $\pm$ 3,23	63,44 $\pm$ 2,18	0,0186	0,5247	0,1570
7	70,00 $\pm$ 2,04	67,50 $\pm$ 3,23	40,00 $\pm$ 7,36	41,25 $\pm$ 7,18	54,69 $\pm$ 4,39	0,0004	0,9071	0,7272
8	68,75 $\pm$ 3,75	72,50 $\pm$ 1,44	26,25 $\pm$ 8,51	36,25 $\pm$ 8,75	50,94 $\pm$ 5,92	< 0,0001	0,2622	0,5998
9	68,75 $\pm$ 2,39	70,00 $\pm$ 2,04	15,00 $\pm$ 13,39	27,50 $\pm$ 10,31	45,31 $\pm$ 7,39	0,0003	0,4319	0,5178
10	68,75 $\pm$ 2,39	68,75 $\pm$ 3,15	30,00 $\pm$ 8,16	13,75 $\pm$ 8,98	45,31 $\pm$ 6,85	< 0,0001	0,2346	0,2346
11	67,50 $\pm$ 1,44	68,75 $\pm$ 3,15	39,38 $\pm$ 15,95	37,50 $\pm$ 13,62	53,28 $\pm$ 6,11	0,0205	0,9771	0,8859
12	65,00 $\pm$ 5,00	66,25 $\pm$ 2,39	22,50 $\pm$ 17,62	41,25 $\pm$ 14,77	48,75 $\pm$ 7,06	0,0083	0,3450	0,4059
13	70,00 $\pm$ 2,04	62,50 $\pm$ 3,23	27,50 $\pm$ 16,39	38,75 $\pm$ 14,34	49,69 $\pm$ 6,65	0,0159	0,8705	0,4235
14	67,50 $\pm$ 1,44	61,25 $\pm$ 3,15	52,50 $\pm$ 9,24	44,06 $\pm$ 14,61	56,33 $\pm$ 4,56	0,1037	0,4301	0,9048
15	67,50 $\pm$ 2,50	63,75 $\pm$ 5,54	61,25 $\pm$ 4,27	42,81 $\pm$ 14,63	58,83 $\pm$ 4,42	0,1286	0,2052	0,3896
16	68,75 $\pm$ 2,39	61,25 $\pm$ 10,48	61,25 $\pm$ 5,15	49,38 $\pm$ 15,63	60,16 $\pm$ 4,75	0,3008	0,3008	0,8098
17	63,75 $\pm$ 3,75	66,25 $\pm$ 3,75	67,50 $\pm$ 1,44	49,69 $\pm$ 15,45	61,80 $\pm$ 4,10	0,3970	0,3155	0,1922
18	65,00 $\pm$ 2,89	55,00 $\pm$ 16,71	62,50 $\pm$ 3,23	50,94 $\pm$ 15,77	58,36 $\pm$ 5,43	0,7366	0,2836	0,9360
19	65,00 $\pm$ 4,56	63,75 $\pm$ 9,66	63,75 $\pm$ 3,75	48,75 $\pm$ 14,63	60,31 $\pm$ 4,48	0,3207	0,3207	0,3970
20	63,75 $\pm$ 4,73	61,25 $\pm$ 10,87	62,50 $\pm$ 4,33	60,00 $\pm$ 7,07	61,88 $\pm$ 3,26	0,8529	0,7115	1,0000
21	66,25 $\pm$ 3,75	52,50 $\pm$ 12,99	66,25 $\pm$ 2,39	53,75 $\pm$ 13,29	59,69 $\pm$ 4,60	0,9402	0,1398	0,9402
22	66,25 $\pm$ 3,75	53,75 $\pm$ 13,13	67,50 $\pm$ 2,50	61,25 $\pm$ 7,74	62,19 $\pm$ 3,82	0,5235	0,1887	0,6467
Média	66,42 $\pm$ 0,80	64,94 $\pm$ 1,46	53,95 $\pm$ 2,50	50,88 $\pm$ 2,62	59,05 $\pm$ 1,06	0,0157	0,6232	0,8626

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,1814

Tempo X Insulação X bST = 0,6126

Gráfico 4 – Motilidade espermática média de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (lbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,001 Tempo X Insulação: 0,001 Tempo X bST: 0,1814 Tempo X Insulação X bST: 0,6126

Tabela 10 – Vigor espermático em escala de 0 a 5 ($\pm$ EPM) de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	3,00 $\pm$ 0,20	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	3,38 $\pm$ 0,24	3,09 $\pm$ 0,08	0,3002	0,3002	0,2306
2	2,88 $\pm$ 0,31	3,00 $\pm$ 0,00	3,13 $\pm$ 0,13	3,38 $\pm$ 0,24	3,09 $\pm$ 0,10	0,1621	0,3846	0,7676
3	2,50 $\pm$ 0,35	2,88 $\pm$ 0,31	3,13 $\pm$ 0,24	3,00 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 0,14	0,0994	0,5554	0,2518
4	2,63 $\pm$ 0,38	2,88 $\pm$ 0,31	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 0,13	0,2126	0,5192	0,5192
5	3,13 $\pm$ 0,13	3,38 $\pm$ 0,24	3,25 $\pm$ 0,14	3,00 $\pm$ 0,20	3,19 $\pm$ 0,09	0,3434	1,0000	0,0766
6	2,75 $\pm$ 0,14	2,75 $\pm$ 0,25	2,25 $\pm$ 0,25	2,25 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 0,11	0,0431	1,0000	1,0000
7	3,00 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 0,25	1,75 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 0,20	2,38 $\pm$ 0,16	0,0006	1,0000	0,2328
8	3,25 $\pm$ 0,25	2,63 $\pm$ 0,24	1,50 $\pm$ 0,29	1,63 $\pm$ 0,24	2,25 $\pm$ 0,22	< 0,0001	0,2518	0,0994
9	3,25 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,48	1,63 $\pm$ 0,24	2,09 $\pm$ 0,29	< 0,0001	0,4854	0,0257
10	3,13 $\pm$ 0,13	2,75 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,41	2,22 $\pm$ 0,24	0,0002	0,0174	0,2192
11	3,00 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 0,25	1,63 $\pm$ 0,63	1,50 $\pm$ 0,50	2,22 $\pm$ 0,25	0,0112	0,6606	0,8831
12	3,13 $\pm$ 0,13	2,75 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,65	1,63 $\pm$ 0,55	2,25 $\pm$ 0,27	0,0113	0,7794	0,5779
13	2,88 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,24	1,13 $\pm$ 0,66	1,63 $\pm$ 0,55	2,06 $\pm$ 0,27	0,0168	0,7961	0,4451
14	2,88 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,24	2,20 $\pm$ 0,36	1,70 $\pm$ 0,48	2,35 $\pm$ 0,19	0,0234	0,2333	0,6801
15	2,88 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,13	1,70 $\pm$ 0,48	2,46 $\pm$ 0,17	0,0518	0,0518	0,2302
16	2,75 $\pm$ 0,14	2,63 $\pm$ 0,43	2,50 $\pm$ 0,20	2,25 $\pm$ 0,60	2,53 $\pm$ 0,18	0,3592	0,5763	0,8511
17	2,50 $\pm$ 0,29	2,63 $\pm$ 0,24	2,75 $\pm$ 0,14	1,95 $\pm$ 0,45	2,46 $\pm$ 0,16	0,4124	0,2054	0,0942
18	2,88 $\pm$ 0,31	2,63 $\pm$ 0,55	3,00 $\pm$ 0,46	2,20 $\pm$ 0,56	2,68 $\pm$ 0,23	0,7152	0,2200	0,5073
19	2,63 $\pm$ 0,24	3,00 $\pm$ 0,35	2,75 $\pm$ 0,32	1,88 $\pm$ 0,31	2,56 $\pm$ 0,18	0,0868	0,3618	0,0398
20	2,50 $\pm$ 0,20	3,00 $\pm$ 0,35	2,63 $\pm$ 0,24	2,38 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,13	0,2861	0,5846	0,1232
21	2,75 $\pm$ 0,32	2,50 $\pm$ 0,50	2,63 $\pm$ 0,13	2,38 $\pm$ 0,31	2,56 $\pm$ 0,16	0,7184	0,4757	1,0000
22	2,75 $\pm$ 0,25	2,50 $\pm$ 0,54	2,88 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,24	2,69 $\pm$ 0,16	0,6783	0,4136	1,0000
Média	2,86 $\pm$ 0,05	2,77 $\pm$ 0,06	2,36 $\pm$ 0,10	2,18 $\pm$ 0,10	2,55 $\pm$ 0,04	0,0140	0,4741	0,8153

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,1538

Tempo X Insulação X bST = 0,0152

Gráfico 5 – Vigor espermático médio de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,0001 Tempo X Insulação: 0,0001 Tempo X bST: 0,1538 Tempo X Insulação X bST: 0,0152

Tabela 11 – Turbilhonamento médio em escala de 0 a 5 ($\pm$ EPM) do sêmen de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	2,63 $\pm$ 0,13	3,25 $\pm$ 0,25	3,38 $\pm$ 0,13	3,38 $\pm$ 0,24	3,16 $\pm$ 0,12	0,0363	0,1130	0,1130
2	2,13 $\pm$ 0,52	2,75 $\pm$ 0,66	3,50 $\pm$ 0,29	3,50 $\pm$ 0,35	2,97 $\pm$ 0,26	0,0582	0,5394	0,5394
3	2,00 $\pm$ 0,68	2,25 $\pm$ 0,60	3,25 $\pm$ 0,43	2,88 $\pm$ 0,66	2,59 $\pm$ 0,30	0,0996	0,9053	0,5558
4	2,13 $\pm$ 0,31	2,88 $\pm$ 0,66	2,88 $\pm$ 0,66	2,63 $\pm$ 0,52	2,63 $\pm$ 0,26	0,5428	0,5428	0,2377
5	3,25 $\pm$ 0,32	3,25 $\pm$ 0,25	3,38 $\pm$ 0,31	2,88 $\pm$ 0,43	3,19 $\pm$ 0,16	0,6582	0,3841	0,3841
6	2,75 $\pm$ 0,43	2,38 $\pm$ 0,80	2,50 $\pm$ 0,54	2,25 $\pm$ 0,32	2,47 $\pm$ 0,25	0,7202	0,5532	0,9047
7	2,38 $\pm$ 0,52	2,63 $\pm$ 0,52	1,38 $\pm$ 0,24	1,25 $\pm$ 0,52	1,91 $\pm$ 0,26	0,0085	0,8638	0,6093
8	3,25 $\pm$ 0,48	2,75 $\pm$ 0,32	0,88 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,38	1,88 $\pm$ 0,34	< 0,0001	0,2598	0,6979
9	2,63 $\pm$ 0,55	2,63 $\pm$ 0,55	0,50 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,36	0,0014	0,8055	0,8055
10	1,88 $\pm$ 0,13	1,88 $\pm$ 0,52	0,50 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	1,06 $\pm$ 0,25	0,0004	0,4226	0,4226
11	2,00 $\pm$ 0,35	3,13 $\pm$ 0,38	1,25 $\pm$ 0,66	1,25 $\pm$ 0,52	1,91 $\pm$ 0,30	0,0244	0,2772	0,2772
12	1,63 $\pm$ 0,55	2,13 $\pm$ 0,66	0,75 $\pm$ 0,75	0,88 $\pm$ 0,31	1,34 $\pm$ 0,30	0,0733	0,5657	0,7288
13	3,00 $\pm$ 0,41	1,38 $\pm$ 0,38	0,75 $\pm$ 0,48	0,88 $\pm$ 0,31	1,50 $\pm$ 0,29	0,0102	0,1114	0,0696
14	1,75 $\pm$ 0,25	2,13 $\pm$ 0,43	1,63 $\pm$ 0,55	1,63 $\pm$ 0,55	1,78 $\pm$ 0,21	0,5423	0,7128	0,7128
15	2,13 $\pm$ 0,55	2,00 $\pm$ 0,58	1,88 $\pm$ 0,52	0,25 $\pm$ 0,25	1,56 $\pm$ 0,30	0,0877	0,1281	0,1847
16	2,25 $\pm$ 0,32	2,63 $\pm$ 0,43	2,38 $\pm$ 0,55	1,00 $\pm$ 0,35	2,06 $\pm$ 0,25	0,1333	0,2999	0,0864
17	2,00 $\pm$ 0,20	2,25 $\pm$ 0,52	2,63 $\pm$ 0,43	1,25 $\pm$ 0,52	2,03 $\pm$ 0,23	0,6935	0,2531	0,1116
18	3,25 $\pm$ 0,48	1,75 $\pm$ 0,78	3,38 $\pm$ 0,38	1,63 $\pm$ 0,69	2,50 $\pm$ 0,34	1,0000	0,0115	0,8132
19	2,50 $\pm$ 0,46	2,63 $\pm$ 0,69	2,50 $\pm$ 0,20	1,63 $\pm$ 0,55	2,31 $\pm$ 0,25	0,3353	0,4648	0,3353
20	1,63 $\pm$ 0,47	2,00 $\pm$ 0,91	2,13 $\pm$ 0,52	1,25 $\pm$ 0,48	1,75 $\pm$ 0,29	0,8607	0,7263	0,3901
21	2,00 $\pm$ 0,74	1,75 $\pm$ 0,78	2,88 $\pm$ 0,13	1,75 $\pm$ 0,75	2,09 $\pm$ 0,32	0,5152	0,3148	0,5152
22	1,88 $\pm$ 0,52	1,88 $\pm$ 0,83	3,00 $\pm$ 0,41	2,38 $\pm$ 0,55	2,28 $\pm$ 0,29	0,1435	0,4564	0,8279
Média	2,32 $\pm$ 0,10	2,38 $\pm$ 0,12	2,15 $\pm$ 0,14	1,61 $\pm$ 0,14	2,11 $\pm$ 0,06	0,1369	0,4220	0,3258

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,0386

Tempo X Insulação X bST =

Gráfico 6 – Turbilhonamento médio do sêmen de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Tempo: 0,0001		Efeitos:	
Tempo X Insulação: 0,0001	Tempo X bST: 0,0386	Tempo X Insulação X bST: 0,5464	

5.6 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Os defeitos de morfologia espermática detectados nos ejaculados serão apresentados individualmente devido aos diferentes momentos de sua manifestação e distintas magnitudes. Ao final desta seção, será apresentada a sumarização do “total de defeitos maiores”, “total de defeitos menores” e do “total de defeitos”.

A incidência de **defeitos de acrossomo** observada à microscopia de contraste de fase era menor que 1% na fase pré-insulação (semanas 1 a 5) para todos os grupos, de modo que nas semanas 4 e 5 este defeito não foi detectado nos grupos CONT, bST, INSUL e IbST. Houve efeito significativo de tempo ($P=0,0001$) e da interação tempo X insulação ($P=0,0002$) sobre os resultados desta variável, como pode ser observado na tabela 12.

Após a insulação testicular, mais precisamente na semana 8 (que corresponde a 16 dias após o final da insulação), os índices de patologia de acrossomo tiveram acréscimo, atingindo um pequeno pico de $2,25 \pm 0,92\%$ de incidência para os animais do grupo INSUL na semana 8 (16 dias após o final da insulação) e de $2,75 \pm 0,92\%$ para os animais do grupo IbST na semana 9 (23 dias após o final da insulação).

Nas semanas 8, 9 e 10 os níveis de defeito de acrossomo para os animais insulados (grupos INSUL e IbST) foram significativamente superiores aos animais dos grupos CONT e bST ($P<0,05$), mas se restabeleceram na semana 11, de modo que a partir da semana 13 até o final do período experimental não foi observado nenhum efeito estatístico significativo da insulação sobre os resultados dos grupos. Não foi observado efeito da interação tempo X bST nem da interação tempo X

insulação X bST. O perfil de ocorrência de defeitos de acrossomo pode ser observado no gráfico 7.

Tabela 12 – Ocorrência média de defeitos de acrossomo em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,25 $\pm$ 0,14	0,50 $\pm$ 0,35	0,50 $\pm$ 0,50	0,88 $\pm$ 0,72	0,53 $\pm$ 0,22	0,1237	0,4692	0,6320
2	0,38 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,75	0,34 $\pm$ 0,19	0,1089	0,7342	0,2914
3	0,38 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,60	0,31 $\pm$ 0,16	0,0324	0,1767	0,3089
4	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,9230	0,3253	0,5870
5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,6858	0,5037	0,8923
6	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,04	0,9164	0,6744	0,8642
7	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,19 $\pm$ 0,09	0,3652	0,7371	0,9388
8	0,25 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,14	2,25 $\pm$ 0,92	2,00 $\pm$ 0,61	1,19 $\pm$ 0,35	0,0620	0,3850	0,5766
9	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,24	1,63 $\pm$ 0,55	2,75 $\pm$ 0,92	1,22 $\pm$ 0,37	0,1477	0,8910	0,9293
10	0,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,31	2,13 $\pm$ 1,01	1,63 $\pm$ 0,85	1,16 $\pm$ 0,36	0,3038	0,8139	0,3123
11	0,13 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,47	0,60 $\pm$ 0,37	0,63 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,18	0,0872	0,4170	0,6127
12	0,25 $\pm$ 0,14	0,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,43	0,60 $\pm$ 0,45	0,42 $\pm$ 0,16	0,0826	0,1060	0,9302
13	0,25 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,13	0,45 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,33	0,41 $\pm$ 0,11	0,3183	0,9725	0,2009
14	0,38 $\pm$ 0,38	0,25 $\pm$ 0,14	0,28 $\pm$ 0,16	0,40 $\pm$ 0,40	0,33 $\pm$ 0,13	0,6912	0,1652	0,8633
15	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,38	0,25 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,38	0,28 $\pm$ 0,13	0,2819	0,8737	0,4732
16	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,35	0,00 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,35	0,24 $\pm$ 0,13	0,8129	0,9057	0,0459
17	0,50 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,33	0,24 $\pm$ 0,10	0,7481	0,7614	0,5272
18	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,13 $\pm$ 0,13	0,40 $\pm$ 0,26	0,26 $\pm$ 0,14	0,8643	0,1462	0,1338
19	0,38 $\pm$ 0,38	0,50 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,29	0,34 $\pm$ 0,16	0,2613	0,6847	0,9721
20	0,13 $\pm$ 0,13	1,25 $\pm$ 1,25	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,44 $\pm$ 0,31	0,7614	0,4092	0,0488
21	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,20	0,25 $\pm$ 0,25	1,13 $\pm$ 0,66	0,50 $\pm$ 0,19	0,9654	0,8362	0,9578
22	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,38 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,38	0,44 $\pm$ 0,16	0,1719	0,4114	0,3102
Média	0,18 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,11	0,42 $\pm$ 0,04	0,4704	0,8647	0,7450

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0002

Tempo X bST = 0,7585

Tempo X Insulação X bST = 0,7706

Gráfico 7 – Ocorrência de defeitos de acrossoomo em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,0001 Tempo X Insulação: 0,0002 Tempo X bST: 0,7585 Tempo X Insulação X bST: 0,7706

Os resultados de ocorrência de **gota protoplasmática proximal** foram influenciados pelos efeitos de tempo ($P=0,0007$) e da interação tempo X insulação ($P=0,0052$), porém não houve efeito das interações tempo X bST ou tempo X insulação X bST, conforme indicado na tabela 13.

As médias de ocorrência para os grupos ao final do período experimental foram de $2,73 \pm 0,51\%$ para o grupo CONT, de $2,20 \pm 0,36\%$ para o grupo bST, de $3,78 \pm 0,86\%$ para o grupo INSUL e $5,53 \pm 1,03\%$ para o grupo lbST. Os animais apresentaram durante a fase pré-insulação (semanas 1 a 5) ocorrência máxima de gota proximal não maior que 2,50%. Contudo, dois dias após o final da insulação testicular os animais dos grupos INSUL e lbST demonstraram rápido acréscimo dessa anomalia, atingindo valores de $19,38 \pm 15,77\%$ e $10,88 \pm 4,96\%$, respectivamente. O declínio das gotas proximais ocorreu tão rapidamente quanto seu aumento, de modo que à semana 8 os animais do grupo INSUL apresentavam valores de $4,00 \pm 1,51\%$ e os animais do grupo bST apresentavam valores de $5,75 \pm 1,89\%$.

Os animais do grupo INSUL apresentaram um segundo aumento súbito de valores na fase de tratamento, mais especificamente na semana 10, atingindo valores médios de 14,50%, os quais logo na semana 11 recuaram para valores considerados normais (5,00%). Os animais do grupo lbST também apresentaram um aumento de gotas proximais durante a fase de tratamento com somatotropina recombinante bovina, porém este aumento se apresentou mais lento e gradual, com expressão máxima na semana 19 ($12,00 \pm 11,83\%$). Após essa semana, os valores declinaram até o final do período experimental, conforme pode ser observado no gráfico 8.

Tabela 13 – Ocorrência média de gota protoplasmática proximal em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	2,00 $\pm$ 1,34	1,88 $\pm$ 0,43	0,75 $\pm$ 0,32	1,25 $\pm$ 0,66	1,47 $\pm$ 0,38	0,2666	0,5882	0,9841
2	2,00 $\pm$ 0,84	2,50 $\pm$ 1,08	1,38 $\pm$ 0,80	1,00 $\pm$ 0,41	1,72 $\pm$ 0,40	0,1494	0,8957	0,7852
3	1,50 $\pm$ 0,54	2,13 $\pm$ 1,07	0,75 $\pm$ 0,60	1,75 $\pm$ 0,92	1,53 $\pm$ 0,39	0,2667	0,1784	0,4711
4	1,25 $\pm$ 0,75	1,50 $\pm$ 0,65	1,00 $\pm$ 0,41	1,75 $\pm$ 0,48	1,38 $\pm$ 0,27	0,7269	0,3078	0,7269
5	1,50 $\pm$ 1,19	0,25 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,48	1,50 $\pm$ 0,87	1,00 $\pm$ 0,38	0,5584	0,7304	0,2551
6	4,38 $\pm$ 3,04	2,38 $\pm$ 1,03	19,38 $\pm$ 15,77	10,88 $\pm$ 4,96	9,25 $\pm$ 4,14	0,1323	0,8711	0,7948
7	4,00 $\pm$ 3,03	2,13 $\pm$ 1,36	7,50 $\pm$ 4,64	6,38 $\pm$ 2,21	5,00 $\pm$ 1,47	0,1788	0,8762	0,7497
8	1,00 $\pm$ 0,68	1,50 $\pm$ 1,17	4,00 $\pm$ 1,51	5,75 $\pm$ 1,89	3,06 $\pm$ 0,79	0,0121	0,4880	0,7791
9	2,25 $\pm$ 1,92	0,50 $\pm$ 0,20	1,75 $\pm$ 0,48	3,38 $\pm$ 1,03	1,97 $\pm$ 0,57	0,0938	0,9542	0,2564
10	2,50 $\pm$ 1,72	1,63 $\pm$ 0,83	14,50 $\pm$ 3,28	6,25 $\pm$ 2,95	6,22 $\pm$ 1,70	0,0169	0,2193	0,2833
11	1,75 $\pm$ 1,42	1,75 $\pm$ 0,95	5,00 $\pm$ 1,85	1,38 $\pm$ 0,24	2,47 $\pm$ 0,68	0,2119	0,4031	0,2051
12	0,58 $\pm$ 0,48	1,50 $\pm$ 0,61	6,28 $\pm$ 2,93	2,93 $\pm$ 1,71	2,82 $\pm$ 0,96	0,0508	0,9058	0,1690
13	0,38 $\pm$ 0,38	2,88 $\pm$ 1,89	3,05 $\pm$ 1,43	4,10 $\pm$ 3,11	2,60 $\pm$ 0,95	0,2310	0,3186	0,3316
14	0,50 $\pm$ 0,35	0,38 $\pm$ 0,13	2,03 $\pm$ 0,75	5,28 $\pm$ 4,62	2,04 $\pm$ 1,17	0,1224	0,9208	0,8720
15	2,50 $\pm$ 0,68	2,00 $\pm$ 1,35	0,88 $\pm$ 0,43	6,45 $\pm$ 6,12	2,96 $\pm$ 1,51	0,5582	0,9390	0,3537
16	2,00 $\pm$ 1,51	5,00 $\pm$ 4,02	0,50 $\pm$ 0,20	8,98 $\pm$ 7,21	4,12 $\pm$ 2,05	0,8984	0,1435	0,4807
17	5,00 $\pm$ 4,50	1,13 $\pm$ 0,31	0,88 $\pm$ 0,31	9,78 $\pm$ 8,78	4,19 $\pm$ 2,40	0,8448	0,6435	0,3038
18	3,50 $\pm$ 1,55	2,13 $\pm$ 1,26	2,00 $\pm$ 1,06	10,83 $\pm$ 10,33	4,61 $\pm$ 2,54	0,9376	0,8598	0,4085
19	6,63 $\pm$ 6,13	2,63 $\pm$ 1,49	2,38 $\pm$ 0,97	12,00 $\pm$ 11,83	5,91 $\pm$ 3,17	0,9942	0,9849	0,9911
20	6,38 $\pm$ 4,55	4,63 $\pm$ 3,82	3,50 $\pm$ 2,70	8,13 $\pm$ 6,97	5,66 $\pm$ 2,18	0,9610	0,9124	0,5483
21	5,50 $\pm$ 4,04	4,38 $\pm$ 3,88	2,88 $\pm$ 2,40	7,00 $\pm$ 5,68	4,94 $\pm$ 1,90	0,9146	0,8104	0,3007
22	3,00 $\pm$ 2,84	3,63 $\pm$ 2,80	2,13 $\pm$ 1,31	5,00 $\pm$ 4,02	3,44 $\pm$ 1,33	0,7535	0,5223	0,9334
Média	2,73 $\pm$ 0,51	2,20 $\pm$ 0,36	3,78 $\pm$ 0,86	5,53 $\pm$ 1,03	3,56 $\pm$ 0,37	0,3764	0,8037	0,7642

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0007

Tempo X Insulação = 0,0052

Tempo X bST = 0,6769

Tempo X Insulação X bST = 0,3151

Gráfico 8 – Ocorrência de gota protoplasmática proximal em espermatozoides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Tempo: 0,0007 Tempo X Insulação: 0,0052 Efeitos: Tempo X bST: 0,6769 Tempo X Insulação X bST: 0,3151

Os touros apresentaram baixa incidência de espermatozóides com **caudas enroladas na cabeça** durante a fase pré-insulação, de modo que os valores das médias semanais desta anomalia variaram entre 0,47% e 0,88%. Com 9 dias passados do final da insulação testicular (semana 7 do experimento), os animais dos grupos INSUL e IbST apresentaram aumento nos valores, de modo que o pico dessa anomalia foi concomitante para ambos grupos e ocorreu na semana 9 (16 dias após o final da insulação). Na referida semana, os valores para o grupo INSUL foram de $22,50 \pm 3,52\%$ e para o grupo IbST de $22,25 \pm 7,69\%$.

Houve efeito do tempo e da interação tempo X insulação ($P=0,0001$) nos resultados de cauda enrolada na cabeça, sendo que, com exceção dos resultados da semana 11, os valores detectados entre as semanas 7 e 13 foram significativamente diferentes, sempre maiores para os animais insulados (INSUL e IbST) quando comparados aos não insulados (CONT e bST). O retorno aos níveis semelhantes aos da fase pré-insulação nos grupos INSUL e IbST ocorreram na semana 17 (79 dias após o final da insulação testicular). Não houve efeito significativo para tempo X bST nem para tempo X insulação X bST, conforme demonstrado na tabela 14 e no gráfico 9.

Tabela 14 – Ocorrência média de cauda enrolada na cabeça em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,75 $\pm$ 0,32	0,50 $\pm$ 0,35	0,38 $\pm$ 0,24	1,13 $\pm$ 0,47	0,69 $\pm$ 0,18	0,7424	0,5439	0,1588
2	0,50 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,59	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,20	0,47 $\pm$ 0,17	0,1318	0,1318	0,3891
3	0,13 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,72	1,38 $\pm$ 1,07	0,75 $\pm$ 0,32	0,78 $\pm$ 0,32	0,1495	0,4936	0,2399
4	0,50 $\pm$ 0,29	0,50 $\pm$ 0,29	0,50 $\pm$ 0,29	1,25 $\pm$ 0,48	0,69 $\pm$ 0,18	0,4047	0,4047	0,4047
5	2,00 $\pm$ 2,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,48	0,88 $\pm$ 0,51	0,7739	1,0000	0,4432
6	0,25 $\pm$ 0,14	0,50 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,60	0,38 $\pm$ 0,17	0,7005	0,1342	0,4454
7	0,63 $\pm$ 0,47	0,13 $\pm$ 0,13	4,75 $\pm$ 2,59	9,13 $\pm$ 5,72	3,66 $\pm$ 1,69	0,0087	0,9322	0,4417
8	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,20	21,25 $\pm$ 8,17	9,38 $\pm$ 6,41	7,81 $\pm$ 3,21	0,0002	0,3352	0,0985
9	0,63 $\pm$ 0,38	0,50 $\pm$ 0,35	22,50 $\pm$ 3,52	22,25 $\pm$ 7,69	11,47 $\pm$ 3,39	< 0,0001	0,6773	0,8490
10	0,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,24	6,13 $\pm$ 1,42	3,88 $\pm$ 2,33	2,72 $\pm$ 0,88	0,0106	0,5591	0,2127
11	0,50 $\pm$ 0,20	0,38 $\pm$ 0,13	2,85 $\pm$ 1,19	4,38 $\pm$ 3,88	2,03 $\pm$ 1,01	0,0582	0,7033	0,8516
12	0,45 $\pm$ 0,17	0,38 $\pm$ 0,13	2,58 $\pm$ 0,69	5,73 $\pm$ 2,95	2,28 $\pm$ 0,88	0,0009	0,4151	0,3197
13	0,50 $\pm$ 0,20	0,13 $\pm$ 0,13	2,15 $\pm$ 0,33	4,85 $\pm$ 2,72	1,91 $\pm$ 0,78	0,0009	0,8493	0,1846
14	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,20	0,98 $\pm$ 0,03	3,33 $\pm$ 2,68	1,20 $\pm$ 0,68	0,0573	0,2885	0,8688
15	0,38 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,61	0,75 $\pm$ 0,43	3,53 $\pm$ 2,28	1,41 $\pm$ 0,63	0,2355	0,1680	0,5900
16	0,38 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,31	0,25 $\pm$ 0,14	2,55 $\pm$ 1,91	1,01 $\pm$ 0,50	0,5451	0,0286	0,3391
17	1,63 $\pm$ 0,85	0,38 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,25	1,90 $\pm$ 1,58	1,16 $\pm$ 0,44	0,8437	0,5105	0,2409
18	1,00 $\pm$ 0,71	0,50 $\pm$ 0,20	0,63 $\pm$ 0,47	1,53 $\pm$ 1,21	0,91 $\pm$ 0,35	0,8351	0,8351	0,4450
19	1,00 $\pm$ 0,35	1,25 $\pm$ 0,63	0,38 $\pm$ 0,24	1,50 $\pm$ 0,79	1,03 $\pm$ 0,27	0,4220	0,2012	0,2783
20	0,88 $\pm$ 0,59	4,13 $\pm$ 3,96	0,38 $\pm$ 0,24	1,13 $\pm$ 0,43	1,63 $\pm$ 0,98	0,6156	0,3018	0,9075
21	0,88 $\pm$ 0,59	3,25 $\pm$ 2,92	0,38 $\pm$ 0,24	1,13 $\pm$ 0,72	1,41 $\pm$ 0,74	0,7000	0,5090	0,9289
22	0,88 $\pm$ 0,59	1,38 $\pm$ 0,90	0,63 $\pm$ 0,47	1,00 $\pm$ 1,00	0,97 $\pm$ 0,35	0,2298	0,4866	0,5962
Média	0,65 $\pm$ 0,12	0,89 $\pm$ 0,23	3,17 $\pm$ 0,76	3,74 $\pm$ 0,75	2,11 $\pm$ 0,28	0,0003	0,1994	0,4719

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,7477

Tempo X Insulação X bST = 0,5175

Gráfico 9 – Ocorrência de cauda enrolada na cabeça em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Os níveis médios semanais de **cabeças isoladas patológicas** variaram entre 0,25 e 0,78% entre as semanas 1 a 5, de forma que a média na semana 5, a qual foi a semana imediatamente anterior ao período de insulação testicular, foi de $0,38 \pm 0,15\%$. Não houve efeito do tempo sobre os resultados, porém a interação tempo X insulação apresentou efeito significativo ($P=0,0012$).

Dezesseis dias após o final da insulação testicular os animais dos grupos INSUL e IbST apresentaram incremento no índice desta anomalia, de modo que os valores máximos para estes grupos foram obtidos na semana 9 para o grupo INSUL ($4,75 \pm 2,14\%$) e na semana 11 para o grupo IbST ($8,38 \pm 7,22\%$). Durante as semanas 8 e 9 (16 a 23 dias após o fim da insulação), os valores médios obtidos para os animais dos grupos insulados foi maior que os valores obtidos para os grupos não insulados.

O declínio dos índices dos grupos INSUL e IbST se iniciou nas semanas 10 e 12, respectivamente, sendo que a remissão dos mesmos para valores próximos aos da fase pré-tratamento ocorreu por volta da semana 19 (93 dias após o final da insulação testicular). Não foi detectado efeito de tempo X bST nem de tempo X insulação X bST, conforme pode ser notado na tabela 15 e no gráfico 10.

Tabela 15 – Ocorrência média de cabeças isoladas patológicas em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,88 $\pm$ 0,38	2,00 $\pm$ 0,87	0,78 $\pm$ 0,30	0,0066	0,5695	0,1767
2	1,00 $\pm$ 0,35	0,75 $\pm$ 0,75	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,47 $\pm$ 0,22	0,0573	0,6592	0,3622
3	0,25 $\pm$ 0,25	0,38 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,10	0,6056	0,6056	0,9296
4	0,75 $\pm$ 0,48	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,31 $\pm$ 0,15	0,2499	0,7871	0,2499
5	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,48	0,25 $\pm$ 0,25	0,38 $\pm$ 0,15	0,5179	0,5179	0,5179
6	0,75 $\pm$ 0,75	0,88 $\pm$ 0,59	0,38 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,54	0,75 $\pm$ 0,26	0,9435	0,2914	0,6782
7	0,13 $\pm$ 0,13	1,63 $\pm$ 0,99	0,75 $\pm$ 0,14	1,88 $\pm$ 1,39	1,09 $\pm$ 0,42	0,4346	0,1322	0,4114
8	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	4,25 $\pm$ 2,15	2,00 $\pm$ 0,87	1,63 $\pm$ 0,68	0,0024	0,4195	0,4195
9	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	4,75 $\pm$ 2,14	2,38 $\pm$ 0,75	1,91 $\pm$ 0,71	0,0089	0,9628	0,4183
10	0,25 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,31	3,75 $\pm$ 3,75	1,31 $\pm$ 0,92	0,2985	0,7585	0,9819
11	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	1,23 $\pm$ 0,62	8,38 $\pm$ 7,22	2,46 $\pm$ 1,85	0,0296	0,2722	0,5036
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,48	0,20 $\pm$ 0,12	7,03 $\pm$ 6,53	1,99 $\pm$ 1,65	0,3363	0,1216	0,5610
13	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,15 $\pm$ 0,09	6,33 $\pm$ 5,66	1,71 $\pm$ 1,44	0,2267	0,1293	0,3634
14	0,25 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,25	0,35 $\pm$ 0,24	6,23 $\pm$ 4,58	1,77 $\pm$ 1,22	0,0477	0,0763	0,0648
15	0,38 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 2,30	0,13 $\pm$ 0,13	6,33 $\pm$ 3,57	2,36 $\pm$ 1,15	0,3504	0,0161	0,1463
16	0,38 $\pm$ 0,38	1,88 $\pm$ 1,88	0,50 $\pm$ 0,29	3,40 $\pm$ 3,24	1,54 $\pm$ 0,90	0,6363	0,3328	0,8792
17	0,00 $\pm$ 0,00	0,88 $\pm$ 0,88	0,38 $\pm$ 0,13	2,58 $\pm$ 2,41	0,96 $\pm$ 0,63	0,2918	0,2015	0,9775
18	0,13 $\pm$ 0,13	6,75 $\pm$ 6,42	0,38 $\pm$ 0,24	2,10 $\pm$ 1,47	2,34 $\pm$ 1,63	0,9776	0,0907	0,6481
19	0,25 $\pm$ 0,14	5,75 $\pm$ 5,75	0,38 $\pm$ 0,38	0,88 $\pm$ 0,72	1,81 $\pm$ 1,43	0,6300	0,2386	0,5757
20	0,50 $\pm$ 0,29	1,75 $\pm$ 1,75	0,25 $\pm$ 0,14	1,13 $\pm$ 0,97	0,91 $\pm$ 0,48	0,8035	0,4668	0,8424
21	0,75 $\pm$ 0,60	1,38 $\pm$ 1,21	0,50 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 1,50	1,03 $\pm$ 0,47	0,8868	0,7313	0,9728
22	0,75 $\pm$ 0,14	1,88 $\pm$ 1,39	0,13 $\pm$ 0,13	1,25 $\pm$ 0,95	1,00 $\pm$ 0,41	0,1496	0,1221	0,5303
Média	0,32 $\pm$ 0,06	1,35 $\pm$ 0,42	0,79 $\pm$ 0,18	2,77 $\pm$ 0,62	1,30 $\pm$ 0,20	0,1272	0,0907	0,6078

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:v

Tempo = 0,2679

Tempo X Insulação = 0,0012

Tempo X bST = 0,1500

Tempo X Insulação X bST = 0,5880

Gráfico 10 – Ocorrência de cabeças isoladas patológicas em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:			
Tempo: 0,2679	Tempo X Insulação: 0,0012	Tempo X bST: 0,1500	Tempo X Insulação X bST: 0,5880

As **cabeças estreitas na base** foram anomalias de pequena incidência em todas as fases do período experimental. As médias ao final do experimento foram diminutas em todos os grupos: $0,16 \pm 0,04\%$ para o CONT, $0,42 \pm 0,09\%$ para o bST, $0,54 \pm 0,08\%$ para o INSUL e $0,47 \pm 0,09\%$ para o lbST. Houve efeito estatístico significativo do fator tempo ($P=0,05$), bem como da interação tempo X insulação ($0,0352$). Quando houve diferença estatística significativa entre os resultados dos animais insulados e não insulados (semanas 7 e 8), os maiores valores atingidos pelos grupos INSUL e lbST foram respectivamente de 1,63% e 1,50%, enquanto os valores mais altos dos grupos CONT e bST foram de 0,13% e 0,38%, respectivamente. Não houve efeito de tempo X bST nem de tempo X insulação X bST, conforme demonstrado na tabela 16.

Os níveis de **cabeças piriformes** apresentados pelos animais na fase pré-insulação testicular eram relativamente baixos e as médias semanais de ocorrência para os dezesseis touros ficaram entre $0,19 \pm 0,10\%$ e $0,56 \pm 0,24\%$, sendo este último valor observado imediatamente antes da insulação testicular (semana 5). Houve efeito de tempo ($P=0,0001$), de tempo X insulação ($P=0,0001$), de tempo X bST ($P=0,0117$) e de tempo X insulação X bST ($P=0,0001$) sobre os resultados dessa patologia, conforme indicado na tabela 17.

O perfil de resposta dos grupos ao longo do tempo é apresentado no gráfico 11. Ao longo das fases de pré-insulação (semanas 1 a 5), pré-tratamento (semanas 6 a 9), tratamento (semanas 10 a 17) e pós-tratamento (semanas 18 a 22), os animais controle (grupo CONT) apresentaram baixos níveis de cabeças piriformes, com pequenas oscilações entre 0 e 1,50%, exceção feita na semana 21, quando houve um pequeno e eventual pico de $2,13 \pm 1,80\%$. Os animais não insulados e que foram tratados com bST (grupo bST) demonstraram oscilações entre 0 e 1,00%

nas semanas 1 a 14 e pico eventual de $3,25 \pm 2,93\%$ na semana 15. Os animais insulados que não receberam bST (grupo INSUL) apresentaram oscilações entre 0 e $0,38\%$ entre as semanas 1 e 7, e consistente aumento de cabeças piriformes entre as semanas 8 e 13 (16 a 51 dias após o final da insulação), com significativo pico de $10,13 \pm 6,34\%$ expresso na semana 8 (16 dias após o final da insulação). Os animais insulados e tratados com bST (grupo IbST) apresentaram níveis de patologia entre 0 e $0,88\%$ entre as semanas 1 e 6, aumento moderado entre as semanas 7 e 9 (9 a 23 dias após o final da insulação), com um pico de $3,25 \pm 1,38\%$ detectado na semana 8 (16 dias após o final da insulação). Entre as semanas 10 e 18, os níveis se mantiveram entre $0,50$ e $0,98\%$, com um novo acréscimo entre as semanas 19 e 22 e eventual pico de patologias da ordem de $4,25 \pm 4,25\%$ na semana 21.

Importante notar que nas semanas 8 e 9, as médias apresentadas pelos grupos insulados (INSUL e IbST) foram significativamente superiores às médias dos animais não insulados (CONT e bST), com $P=0,0030$ e $P=0,0377$. Ressaltem-se também os efeitos significativos da aplicação de bST e da interação entre insulação e bST detectados durante as semanas 10 e 11 (30 e 37 dias após o final da insulação), quando o efeito da insulação foi determinante para que os animais insulados apresentassem médias de cabeça piriforme significativamente superiores aos não insulados ($P=0,0007$ e $P=0,0032$), com valores detectados de $0,00 \pm 0,00\%$ e $0,13 \pm 0,13\%$ para o grupo CONT, de $0,38 \pm 0,24\%$ e $1,00 \pm 0,84\%$ para o grupo bST, de $5,50 \pm 1,06\%$ e $5,85 \pm 0,74\%$ para o grupo INSUL e de $0,75 \pm 0,75\%$ e $0,50 \pm 0,20\%$ para o grupo IbST. O efeito da aplicação do bST também foi significativo nas semanas 10 e 11 ($P=0,0110$ e $P=0,0244$), porém os animais insulados que receberam aplicação de bST apresentaram níveis significativamente menores de

cabeças piriformes que os animais insulados não tratados com bST ($P=0,0012$ e $P=0,0016$).

Tabela 16 – Ocorrência média de cabeças estreitas na base em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,31	0,25 $\pm$ 0,11	0,3165	0,1461	0,6087
2	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,25	0,19 $\pm$ 0,09	0,5471	0,5471	0,5471
3	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,13	0,19 $\pm$ 0,08	1,0000	0,0150	1,0000
4	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,06	0,3173	0,3173	0,3434
5	0,00 $\pm$ 0,00	2,25 $\pm$ 1,31	0,75 $\pm$ 0,48	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,39	0,3288	0,3288	0,0689
6	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,47	0,22 $\pm$ 0,13	0,2674	0,4961	0,2674
7	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,13	1,38 $\pm$ 0,38	0,75 $\pm$ 0,75	0,63 $\pm$ 0,23	0,0520	0,7564	0,2328
8	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	1,63 $\pm$ 0,75	1,50 $\pm$ 0,50	0,88 $\pm$ 0,28	0,0225	1,0000	0,8082
9	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,71	1,13 $\pm$ 0,52	0,59 $\pm$ 0,23	0,0938	0,9034	0,9034
10	0,50 $\pm$ 0,20	0,13 $\pm$ 0,13	1,38 $\pm$ 0,55	0,50 $\pm$ 0,29	0,63 $\pm$ 0,19	0,1109	0,1109	0,4974
11	0,25 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,54	1,20 $\pm$ 0,45	0,38 $\pm$ 0,13	0,71 $\pm$ 0,19	0,6932	0,9271	0,0797
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,63	0,88 $\pm$ 0,43	0,18 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,19	0,1029	0,9039	0,1145
13	0,25 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,43	0,63 $\pm$ 0,31	0,10 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,14	0,6182	0,9636	0,0866
14	0,50 $\pm$ 0,20	0,38 $\pm$ 0,24	0,70 $\pm$ 0,18	0,15 $\pm$ 0,15	0,43 $\pm$ 0,10	0,9458	0,0917	0,2650
15	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,38	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,20	0,14 $\pm$ 0,10	0,6398	0,1461	0,6398
16	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,23	0,18 $\pm$ 0,09	0,2758	0,0761	0,9183
17	0,50 $\pm$ 0,20	0,50 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,14	0,28 $\pm$ 0,28	0,38 $\pm$ 0,14	0,3700	0,9615	0,9615
18	0,25 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,38	0,58 $\pm$ 0,34	0,33 $\pm$ 0,13	0,2564	0,8779	0,5106
19	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,29	0,38 $\pm$ 0,38	0,22 $\pm$ 0,12	0,0707	0,7763	0,7763
20	0,50 $\pm$ 0,50	0,38 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,24	0,34 $\pm$ 0,14	0,5414	0,8371	0,5414
21	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,14	1,25 $\pm$ 1,25	0,53 $\pm$ 0,32	0,4770	0,2736	0,6089
22	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,50	0,28 $\pm$ 0,14	0,8486	0,5700	0,5700
Média	0,16 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,04	0,1450	0,5068	0,2502

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0500

Tempo X Insulação = 0,0352

Tempo X bST = 0,6135

Tempo X Insulação X bST = 0,0866

Tabela 17 – Ocorrência média de cabeças piriformes em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,59	0,31 $\pm$ 0,16	0,1560	0,3370	0,6425
2	0,13 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,88	0,25 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,13	0,34 $\pm$ 0,22	0,6588	0,6588	0,3477
3	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,22 $\pm$ 0,14	1,0000	0,2878	0,5252
4	0,75 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,10	0,0628	0,0628	0,0150
5	1,50 $\pm$ 0,65	0,50 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,56 $\pm$ 0,24	0,0368	0,3682	0,0906
6	0,38 $\pm$ 0,24	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,38	0,25 $\pm$ 0,12	0,3692	0,8358	0,3722
7	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	1,75 $\pm$ 1,44	0,53 $\pm$ 0,37	0,0960	0,4632	0,4632
8	0,38 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	10,13 $\pm$ 6,34	3,25 $\pm$ 1,38	3,50 $\pm$ 1,78	0,0030	0,2412	0,4037
9	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,50	8,50 $\pm$ 4,63	1,25 $\pm$ 1,09	2,63 $\pm$ 1,39	0,0377	0,1613	0,1077
10	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	5,50 $\pm$ 1,06	0,75 $\pm$ 0,75	1,66 $\pm$ 0,65	0,0007	0,0110	0,0012
11	0,13 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,84	5,85 $\pm$ 0,74	0,50 $\pm$ 0,20	1,87 $\pm$ 0,65	0,0032	0,0244	0,0016
12	0,25 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,75	3,58 $\pm$ 1,26	0,78 $\pm$ 0,43	1,34 $\pm$ 0,48	0,0463	0,2219	0,1045
13	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	1,15 $\pm$ 0,69	0,28 $\pm$ 0,28	0,48 $\pm$ 0,23	0,3477	0,8018	0,2122
14	0,88 $\pm$ 0,59	0,63 $\pm$ 0,63	0,73 $\pm$ 0,30	0,68 $\pm$ 0,42	0,73 $\pm$ 0,23	0,8145	0,6202	0,8367
15	0,00 $\pm$ 0,00	3,25 $\pm$ 2,93	0,50 $\pm$ 0,20	0,70 $\pm$ 0,55	1,11 $\pm$ 0,74	0,9462	0,1664	0,1893
16	1,13 $\pm$ 0,66	2,25 $\pm$ 2,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,70 $\pm$ 0,70	1,02 $\pm$ 0,59	0,1619	0,5694	0,5410
17	0,88 $\pm$ 0,52	2,00 $\pm$ 2,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,85 $\pm$ 0,85	0,93 $\pm$ 0,53	0,2477	0,4705	0,5708
18	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,75	0,25 $\pm$ 0,25	0,98 $\pm$ 0,98	0,49 $\pm$ 0,30	0,6615	0,2786	0,8099
19	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,35	1,13 $\pm$ 1,13	0,44 $\pm$ 0,29	0,1776	0,6703	0,9903
20	2,00 $\pm$ 1,84	1,25 $\pm$ 1,25	0,38 $\pm$ 0,24	0,63 $\pm$ 0,47	1,06 $\pm$ 0,54	0,5342	0,8996	0,6760
21	2,13 $\pm$ 1,80	0,88 $\pm$ 0,52	0,88 $\pm$ 0,72	4,25 $\pm$ 4,25	2,03 $\pm$ 1,11	0,9348	0,9626	0,5611
22	1,63 $\pm$ 0,80	1,75 $\pm$ 1,42	0,63 $\pm$ 0,47	2,00 $\pm$ 2,00	1,50 $\pm$ 0,60	0,3337	0,9843	0,5917
Média	0,56 $\pm$ 0,14	0,84 $\pm$ 0,22	1,80 $\pm$ 0,45	1,01 $\pm$ 0,25	1,05 $\pm$ 0,15	0,2648	0,7040	0,4961

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,0117

Tempo X Insulação X bST = 0,0001

Gráfico 11 – Ocorrência de cabeças piriformes em espermatozoides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:

Tempo: 0,0001 Tempo X Insulação: 0,0001 Tempo X bST: 0,0117 Tempo X Insulação X bST: 0,0001

Os níveis médios de ocorrência de **cabeças pequenas anormais** foram influenciados pelos efeitos de tempo ($P=0,0268$) e da interação tempo X insulação ($P=0,0095$), sem, contudo, haver efeito significativo das interações tempo X bST ou tempo X insulação X bST, como demonstrado na tabela 18. As médias de ocorrência para os grupos ao final do período experimental foram de $0,19 \pm 0,07\%$ para o grupo CONT, de $0,18 \pm 0,08\%$ para o grupo bST, de $0,59 \pm 0,19\%$ para o grupo INSUL e $1,10 \pm 0,26\%$ para o grupo lbST.

Como pode ser visto no gráfico 12, os animais dos grupos INSUL e lbST apresentaram aumento nos níveis dessa anomalia a partir da semana 7 (9 dias após o término da insulação) com ocorrência máxima de cabeças pequenas anormais para os animais do grupo INSUL da ordem de $6,50 \pm 1,71\%$ na semana 9 (16 dias após o final da insulação) e da ordem de $4,25 \pm 3,61\%$ na semana 7 (9 dias após o final da insulação) para os animais do grupo lbST. Durante as semanas 8 e 9, os animais insulados apresentaram níveis de cabeças pequenas anormais significativamente mais altos que os animais não insulados.

Curioso notar que os animais dos grupos CONT, bST e INSUL apresentaram valores nulos para esta patologia seminal em 13 de 22 semanas ao longo do período experimental, evento notado também em 4 semanas para os animais do grupo lbST.

Tabela 18 – Ocorrência média de cabeças pequenas anormais em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
2	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,03	0,3173	0,3173	0,3434
3	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
4	0,50 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,50	0,31 $\pm$ 0,18	0,5892	0,9892	0,3846
5	1,75 $\pm$ 1,03	0,50 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,75	0,75 $\pm$ 0,34	0,2079	0,6618	0,1039
6	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,63	0,22 $\pm$ 0,16	0,9273	0,9273	0,2419
7	0,12 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 1,25	4,25 $\pm$ 3,61	1,41 $\pm$ 0,96	0,1900	0,8903	0,4466
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 1,40	1,13 $\pm$ 0,47	1,16 $\pm$ 0,50	0,0083	0,1182	0,1182
9	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	6,50 $\pm$ 1,71	2,63 $\pm$ 0,80	2,31 $\pm$ 0,80	0,0009	0,0597	0,0743
10	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,50	1,13 $\pm$ 0,66	0,44 $\pm$ 0,22	0,1305	0,4269	0,5926
11	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	2,50 $\pm$ 2,50	0,66 $\pm$ 0,62	0,1441	0,9273	0,3700
12	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,50 $\pm$ 0,29	2,45 $\pm$ 2,12	0,83 $\pm$ 0,54	0,1297	0,2438	0,4562
13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 1,84	0,50 $\pm$ 0,47	0,1441	0,1441	0,3046
14	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,58 $\pm$ 1,58	0,46 $\pm$ 0,39	0,9273	0,9273	0,2896
15	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 1,25	0,34 $\pm$ 0,31	0,9273	0,1441	0,3783
16	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,95 $\pm$ 0,95	0,24 $\pm$ 0,24	0,3173	0,3173	0,3434
17	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,63	0,16 $\pm$ 0,16	0,3173	0,3173	0,3434
18	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,33	0,27 $\pm$ 0,15	0,4941	0,3601	0,9027
19	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
20	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,50	0,22 $\pm$ 0,14	0,4026	0,1773	0,7763
21	0,75 $\pm$ 0,60	1,50 $\pm$ 1,50	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00	0,81 $\pm$ 0,45	0,4697	0,3182	0,8833
22	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,50	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,14	0,3893	0,6618	0,6618
Média	0,19 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,19	1,10 $\pm$ 0,26	0,51 $\pm$ 0,09	0,0331	0,3569	0,3368

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0268

Tempo X Insulação = 0,0095

Tempo X bST = 0,3140

Tempo X Insulação X bST = 0,3421

Gráfico 12 – Ocorrência de cabeças pequenas anormais em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:

Tempo: 0,0268 Tempo X Insulação: 0,0095 Tempo X bST: 0,3140 Tempo X Insulação X bST: 0,3421

As anomalias de **contorno anormal de cabeça** foram detectadas em níveis relativamente baixos durante o período experimental, de modo que as médias finais de ocorrência por grupo foram de $0,30 \pm 0,05\%$ para CONT, de $0,67 \pm 0,22\%$ para bST, de $0,50 \pm 0,09\%$ para INSUL e de $1,30 \pm 0,26\%$ para lbST. O evento mais importante relativo a esta patologia foi o aumento nos níveis expressos pelos animais insulados (INSUL e lbST) durante o período pré-tratamento, que iniciou-se na semana 7 (9 dias após o final da insulação) para o grupo INSUL e na semana 6 (2 dias após o final da insulação) para o grupo lbST, conforme registrado na tabela 19.

Observa-se no gráfico 13 que durante as semanas 7 a 10 os níveis de contorno anormal de cabeça foram significativamente mais elevados para os animais insulados quando comparados aos animais não insulados ($P < 0,05$), com máximo de ocorrência registrada na semana 8 para os animais do grupo INSUL ($1,62 \pm 1,01\%$) e na semana 7 para os animais do grupo lbST ($5,50 \pm 3,18\%$). O declínio nos níveis dessa anomalia teve início na semana 9 para o grupo INSUL e na semana 8 para os animais do grupo lbST, sendo um pouco mais lento para os animais do grupo lbST, os quais mantiveram níveis de expressão entre 1 e 2 % durante as semanas 10 a 15. O grupo bST apresentou um eventual pico de expressão desse defeito na semana 20 ($4,38 \pm 4,21$), pouco importante devido ao fato de não haver sido constatado efeito significativo do bST nem de suas interações nessa semana e do erro padrão da média ser elevado, confirmando uma grande variação individual para a característica naquele momento.

Tabela 19 – Ocorrência média de contorno anormal de cabeça em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,63 $\pm$ 0,24	0,50 $\pm$ 0,35	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,14	0,41 $\pm$ 0,12	0,2386	0,7886	0,6558
2	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,20	0,31 $\pm$ 0,10	0,8888	0,0064	0,4191
3	0,13 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,47	0,25 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,13	0,28 $\pm$ 0,14	0,5387	0,5387	0,3029
4	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,48	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,14	0,4501	0,4501	0,1079
5	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,29	0,38 $\pm$ 0,15	0,8699	0,5360	0,8699
6	0,50 $\pm$ 0,20	0,63 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,43	0,47 $\pm$ 0,14	0,3108	0,1541	0,2862
7	0,50 $\pm$ 0,20	0,50 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 1,02	5,50 $\pm$ 3,18	2,00 $\pm$ 0,92	0,0315	0,1573	0,1829
8	0,12 $\pm$ 0,13	0,12 $\pm$ 0,13	1,62 $\pm$ 1,01	1,00 $\pm$ 0,46	0,72 $\pm$ 0,30	0,0210	0,7235	0,7235
9	0,75 $\pm$ 0,32	0,25 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,65	2,37 $\pm$ 0,38	1,22 $\pm$ 0,28	0,0118	0,8672	0,1134
10	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	1,25 $\pm$ 0,25	1,75 $\pm$ 1,11	0,84 $\pm$ 0,32	0,0215	0,8825	0,8825
11	0,38 $\pm$ 0,24	0,75 $\pm$ 0,48	0,78 $\pm$ 0,10	2,00 $\pm$ 2,00	0,98 $\pm$ 0,49	0,5166	0,7984	0,7498
12	0,33 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,20	2,65 $\pm$ 1,52	0,90 $\pm$ 0,43	0,0248	0,2194	0,0598
13	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,29	0,33 $\pm$ 0,12	1,90 $\pm$ 1,41	0,68 $\pm$ 0,37	0,1379	0,0766	0,7306
14	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,20 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 1,30	0,44 $\pm$ 0,32	0,4121	0,3996	0,8296
15	0,25 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,13	1,08 $\pm$ 1,08	0,43 $\pm$ 0,27	0,8157	0,5188	0,5188
16	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,83	0,30 $\pm$ 0,21	0,8174	0,2785	0,4591
17	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,52	0,40 $\pm$ 0,16	0,0312	0,0507	0,1596
18	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,35 $\pm$ 0,35	0,15 $\pm$ 0,10	0,1441	0,9273	0,8802
19	0,25 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,14	0,19 $\pm$ 0,08	0,3628	0,3628	0,2311
20	0,38 $\pm$ 0,13	4,38 $\pm$ 4,21	0,63 $\pm$ 0,47	1,50 $\pm$ 1,50	1,72 $\pm$ 1,09	0,6684	0,3207	0,5121
21	0,75 $\pm$ 0,75	2,38 $\pm$ 2,21	0,13 $\pm$ 0,13	2,25 $\pm$ 2,25	1,38 $\pm$ 0,77	0,6526	0,3078	0,8511
22	1,00 $\pm$ 0,20	1,13 $\pm$ 0,97	0,38 $\pm$ 0,38	0,75 $\pm$ 0,75	0,81 $\pm$ 0,30	0,1362	0,8834	0,4519
Média	0,30 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,22	0,50 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,26	0,70 $\pm$ 0,09	0,1238	0,1219	0,4895

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0009

Tempo X Insulação = 0,0054

Tempo X bST = 0,7385

Tempo X Insulação X bST = 0,5469

Gráfico 13 – Ocorrência de contorno anormal de cabeça em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,0009 Tempo X Insulação: 0,0054 Tempo X bST: 0,7385 Tempo X Insulação X bST: 0,5469

Os níveis detectados de **pouch formation** foram relativamente baixos ao longo do período experimental, tanto em frequência quanto em magnitude, como registrado na tabela 20. Em 57 das 88 amostras colhidas ao longo do experimento (64,77%), o valor detectado para este defeito morfológico foi nulo. Durante as 22 semanas do período experimental, as médias semanais dos dezesseis touros oscilaram entre 0 e 0,97%. As médias dos grupos ao longo do tempo foram de $0,02 \pm 0,11\%$ para o grupo CONT, de $0,17 \pm 0,05\%$ para o grupo bST, de $0,12 \pm 0,06\%$ para o grupo INSUL e de $0,23 \pm 0,07\%$ para o grupo IbST.

Apesar dos pequenos valores numéricos observados, houve efeito significativo de tempo ($P=0,0081$) e da interação tempo X insulação ($P=0,0068$) sobre os resultados. Nas semanas 8 e 9 as médias encontradas para os grupos insulados foram significativamente maiores que as médias dos grupos de animais não insulados ($P<0,05$), com picos de 1,75% no grupo INSUL e 2,00% no grupo IbST. Este evento pode ser visualizado no gráfico 14. No restante das semanas, não houve efeito algum de insulação, aplicação de bST ou suas interações.

A ocorrência de **patologias de peça intermediária** como fibrilação, fratura parcial, fratura total, edema e pseudogotas foi numericamente baixa ao longo das 22 semanas, de modo que os valores médios semanais oscilaram entre $0,34 \pm 0,14\%$ e $1,41 \pm 0,54\%$. Não houve efeito significativo de tempo, nem das interações de tempo X insulação, tempo X bST, ou tempo X insulação X bST, como pode ser observado na tabela 21. Os níveis médios detectados foram de $0,58 \pm 0,08\%$ para o grupo CONT, de $0,71 \pm 0,11\%$ para o grupo bST, de $0,97 \pm 0,10\%$ para o grupo INSUL e de $1,08 \pm 0,14\%$ para o grupo IbST.

Tabela 20 – Ocorrência média de *pouch formation* em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,06 $\pm$ 0,06	0,3173	0,3173	0,3434
2	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,03	0,3173	0,3173	0,3434
3	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
4	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
6	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
7	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,09 $\pm$ 0,07	0,9273	0,1441	0,6141
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,75 $\pm$ 0,32	0,28 $\pm$ 0,12	0,0187	0,3650	0,3650
9	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	1,75 $\pm$ 1,03	2,00 $\pm$ 1,06	0,97 $\pm$ 0,41	0,0447	0,9377	0,8149
10	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,47	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,28 $\pm$ 0,17	0,8304	0,0784	0,8304
11	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,03	0,3173	0,3173	0,3434
12	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,19 $\pm$ 0,90	1,0000	0,5633	1,0000
13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
14	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,06 $\pm$ 0,04	1,0000	0,1432	1,0000
15	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,35	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,10	0,1441	0,1441	0,1909
16	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,03	0,3173	0,3173	0,3434
17	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,07	0,1441	0,9273	0,6141
18	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,0000	1,0000	1,0000
19	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,16 $\pm$ 0,13	0,9273	0,1441	0,4961
20	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,75	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,19	0,9273	0,9273	0,2875
21	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,50	0,22 $\pm$ 0,14	0,8035	0,1064	0,8035
22	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,07	0,4875	0,6434	0,2518
Média	0,02 $\pm$ 0,11	0,17 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,07	0,13 $\pm$ 0,03	0,2587	0,0754	0,7617

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0081

Tempo X Insulação = 0,0068

Tempo X bST = 0,7822

Tempo X Insulação X bST = 0,8711

Gráfico 14 – Ocorrência de *pouch formation* em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Tabela 21 – Ocorrência média de patologias de peça intermediária (fibrilação, fratura total ou parcial, edema, pseudogotas) em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,50 $\pm$ 0,20	0,50 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,38	0,41 $\pm$ 0,13	0,4739	0,2443	0,2443
2	0,38 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,47	0,75 $\pm$ 0,43	0,50 $\pm$ 0,16	0,1461	1,0000	0,6087
3	0,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,88 $\pm$ 0,43	0,25 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,14	0,1570	0,1570	0,5247
4	0,75 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,48	1,00 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,18	0,5086	0,2019	0,2019
5	0,75 $\pm$ 0,48	2,00 $\pm$ 1,08	0,25 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,25	0,81 $\pm$ 0,33	0,0947	0,3265	0,3265
6	0,38 $\pm$ 0,24	0,50 $\pm$ 0,29	2,13 $\pm$ 0,99	0,63 $\pm$ 0,24	0,91 $\pm$ 0,30	0,0782	0,1791	0,1192
7	0,13 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,47	0,88 $\pm$ 0,43	0,63 $\pm$ 0,24	0,56 $\pm$ 0,17	0,3598	0,7551	0,3598
8	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,20	1,00 $\pm$ 0,20	1,75 $\pm$ 0,85	0,84 $\pm$ 0,26	0,0275	0,1978	0,6540
9	0,25 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,48	1,88 $\pm$ 0,72	0,81 $\pm$ 0,26	0,0391	0,1659	0,2585
10	0,00 $\pm$ 0,00	1,75 $\pm$ 1,13	0,88 $\pm$ 0,43	3,00 $\pm$ 1,68	1,41 $\pm$ 0,54	0,2552	0,0539	0,8350
11	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,35	1,18 $\pm$ 0,59	0,63 $\pm$ 0,31	0,64 $\pm$ 0,20	0,1962	0,6993	0,3152
12	0,58 $\pm$ 0,27	0,63 $\pm$ 0,38	1,20 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,58	0,95 $\pm$ 0,19	0,1033	0,7536	0,8503
13	1,00 $\pm$ 0,46	2,00 $\pm$ 1,34	1,03 $\pm$ 0,35	0,58 $\pm$ 0,34	1,15 $\pm$ 0,36	0,3058	0,6797	0,2898
14	0,25 $\pm$ 0,14	0,63 $\pm$ 0,31	1,33 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,41	0,83 $\pm$ 0,16	0,0055	0,7334	0,1934
15	0,63 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,35	1,00 $\pm$ 0,54	0,81 $\pm$ 0,18	0,1516	1,0000	1,0000
16	0,88 $\pm$ 0,72	0,38 $\pm$ 0,24	1,38 $\pm$ 0,88	1,03 $\pm$ 0,70	0,91 $\pm$ 0,32	0,2203	0,6558	0,9228
17	1,13 $\pm$ 0,38	0,25 $\pm$ 0,14	1,38 $\pm$ 0,52	1,33 $\pm$ 0,85	1,02 $\pm$ 0,27	0,2568	0,4198	0,4701
18	0,75 $\pm$ 0,48	1,00 $\pm$ 0,35	0,88 $\pm$ 0,24	1,48 $\pm$ 1,00	1,03 $\pm$ 0,27	0,6509	0,5239	0,7910
19	0,63 $\pm$ 0,38	0,63 $\pm$ 0,38	0,75 $\pm$ 0,43	2,13 $\pm$ 1,09	1,03 $\pm$ 0,33	0,2327	0,3071	0,3071
20	1,38 $\pm$ 0,38	0,38 $\pm$ 0,13	1,25 $\pm$ 0,52	1,25 $\pm$ 0,43	1,06 $\pm$ 0,20	0,4069	0,2759	0,2759
21	0,38 $\pm$ 0,24	0,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,72	0,53 $\pm$ 0,20	0,3171	0,8831	0,6606
22	1,50 $\pm$ 0,54	1,13 $\pm$ 0,52	1,00 $\pm$ 0,35	1,25 $\pm$ 0,60	1,22 $\pm$ 0,23	0,7452	0,9135	0,5900
Média	0,58 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,11	0,97 $\pm$ 0,10	1,08 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,06	0,0434	0,4806	0,9590

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,2187

Tempo X Insulação = 0,1616

Tempo X bST = 0,1347

Tempo X Insulação X bST = 0,6743

Os resultados de ocorrência de **cauda fortemente dobrada** foram influenciados pelos efeitos de tempo ($P=0,0001$) e da interação tempo X insulação ($P=0,0009$). Não houve, para esta variável, efeito das interações tempo X bST ou tempo X insulação X bST, conforme indicado na tabela 22.

As médias de ocorrência para os grupos ao final do período experimental foram de $0,63 \pm 0,08\%$ para o grupo CONT, de $0,69 \pm 0,09\%$ para o grupo bST, de $1,68 \pm 0,24\%$ para o grupo INSUL e $1,51 \pm 0,20\%$ para o grupo lbST. Durante a semana 5, imediatamente antes de ser iniciada a insulação testicular, a média semanal de caudas fortemente dobradas para os dezesseis touros era de $1,06 \pm 0,32\%$. Com a insulação, a expressão desta anomalia no sêmen aumentou a partir da semana 6 para os grupos insulados, de modo que foram originados picos de patologia da ordem de $7,25 \pm 2,76\%$ na semana 6 (2 dias após o final da insulação) para o grupo INSUL e da ordem de $4,63 \pm 1,40\%$ na semana 9 (23 dias após o final da insulação) para o grupo lbST.

As médias apresentadas pelos grupos insulados foram significativamente superiores às médias dos grupos não insulados nas semanas 6, 7, 9, 10 e 13 ($P=0,0234$; $P=0,0267$; $P=0,0033$; $P=0,0340$; $P=0,0309$, respectivamente). Como pode ser observado no gráfico 15, com exceção dos momentos de pico apresentados pelos grupos INSUL e lbST, todas as oscilações de médias ao longo do tempo foram bastante similares entre os grupos, não determinando diferença estatística significativa nos resultados.

Tabela 22 – Ocorrência média de cauda fortemente dobrada em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,63 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,32	1,00 $\pm$ 0,35	2,75 $\pm$ 2,26	1,28 $\pm$ 0,56	0,4063	0,7056	0,7682
2	0,75 $\pm$ 0,43	0,63 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,38	1,13 $\pm$ 0,66	0,78 $\pm$ 0,21	0,7128	0,7128	0,5423
3	0,63 $\pm$ 0,31	0,50 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,61	1,63 $\pm$ 0,66	1,06 $\pm$ 0,25	0,0706	1,0000	0,8035
4	1,00 $\pm$ 0,58	0,25 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,29	0,56 $\pm$ 0,20	0,7465	0,3434	0,3434
5	0,50 $\pm$ 0,50	1,50 $\pm$ 0,50	1,25 $\pm$ 0,95	1,00 $\pm$ 0,71	1,06 $\pm$ 0,32	0,8338	0,5333	0,3083
6	0,13 $\pm$ 0,13	1,25 $\pm$ 0,60	7,25 $\pm$ 2,76	2,00 $\pm$ 0,35	2,66 $\pm$ 0,95	0,0234	0,1872	0,0548
7	0,63 $\pm$ 0,31	0,25 $\pm$ 0,14	4,13 $\pm$ 1,52	1,25 $\pm$ 0,32	1,56 $\pm$ 0,53	0,0267	0,0885	0,1759
8	0,13 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,29	1,13 $\pm$ 0,80	0,75 $\pm$ 0,32	0,63 $\pm$ 0,23	0,1523	1,0000	0,3726
9	0,75 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,24	3,63 $\pm$ 0,94	4,63 $\pm$ 1,40	2,34 $\pm$ 0,61	0,0033	0,7363	0,4643
10	0,50 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,35	2,00 $\pm$ 0,82	0,91 $\pm$ 0,27	0,0340	0,5275	0,1822
11	0,50 $\pm$ 0,20	0,63 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,24	1,25 $\pm$ 0,60	0,81 $\pm$ 0,18	0,2254	0,5314	0,7523
12	0,58 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,68	2,13 $\pm$ 0,97	1,75 $\pm$ 0,72	1,36 $\pm$ 0,35	0,1593	0,9741	0,6065
13	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,29	0,88 $\pm$ 0,38	1,25 $\pm$ 0,43	0,66 $\pm$ 0,19	0,0309	0,2022	0,8486
14	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,20	1,13 $\pm$ 0,38	1,63 $\pm$ 1,18	0,81 $\pm$ 0,32	0,0893	0,4193	1,0000
15	0,63 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,71	0,75 $\pm$ 0,32	1,75 $\pm$ 0,92	1,03 $\pm$ 0,30	0,5298	0,3313	0,6518
16	0,63 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,31	1,00 $\pm$ 0,46	0,25 $\pm$ 0,14	0,63 $\pm$ 0,16	1,0000	0,3034	0,3034
17	0,63 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,38	1,00 $\pm$ 0,84	0,88 $\pm$ 0,52	0,78 $\pm$ 0,25	0,5940	0,9144	0,9144
18	2,25 $\pm$ 1,03	1,63 $\pm$ 1,14	3,00 $\pm$ 0,96	3,38 $\pm$ 1,70	2,56 $\pm$ 0,58	0,3828	0,9289	0,7221
19	0,88 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,38	1,00 $\pm$ 0,41	0,50 $\pm$ 0,35	0,75 $\pm$ 0,16	1,0000	0,3165	0,7318
20	0,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,31	1,38 $\pm$ 0,90	0,75 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,25	0,1936	0,7851	0,2901
21	0,88 $\pm$ 0,31	0,50 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,72	0,13 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,20	0,6783	0,2306	0,6783
22	1,00 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,38	0,88 $\pm$ 0,52	2,13 $\pm$ 0,90	1,22 $\pm$ 0,28	0,3740	0,3740	0,2824
Média	0,63 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,09	1,68 $\pm$ 0,24	1,51 $\pm$ 0,20	1,13 $\pm$ 0,09	0,0091	0,8632	0,6936

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0009

Tempo X bST = 0,3695

Tempo X Insulação X bST = 0,0605

Gráfico 15 – Ocorrência de cauda fortemente dobrada em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,0001 Tempo X Insulação: 0,0009 Tempo X bST: 0,3695 Tempo X Insulação X bST: 0,0605

Os valores de ocorrência média de espermatozóides com **cauda dobrada com gota** demonstram que não houve magnitude desta anomalia, a qual variou para os dezesseis touros entre $1,06 \pm 0,52\%$ e $2,09 \pm 0,83\%$ durante a fase pré-insulação conforme apontado na tabela 23. Estatisticamente, houve efeito do tempo ($P=0,0046$) e de tempo X insulação ($P=0,0350$) sobre os resultados desta variável, porém ao longo das 22 semanas experimentais somente em um momento (semana 19) houve incremento nos níveis de cauda dobrada associado à insulação no sêmen de animais do grupo INSUL e IbST.

Apesar disso, tanto os grupos INSUL como IbST apresentaram rápido e imediato aumento nos valores de cauda dobrada com gota, manifestando pico de ocorrência da ordem de $17,38 \pm 7,55\%$ para animais do grupo INSUL e da ordem de $9,38 \pm 6,96\%$ para animais do grupo IbST. Esse pico foi fugaz e o declínio desses valores ocorreu logo na semana 7 para ambos grupos, com o retorno aos níveis compatíveis com a fase pré-insulação já na semana 8 ($0,25 \pm 0,14\%$ para o grupo INSUL e $0,88 \pm 0,24\%$ para o grupo IbST), correspondendo a 16 dias após o término da insulação.

Tabela 23 – Ocorrência média de cauda dobrada com gota em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	1,00 $\pm$ 0,71	1,00 $\pm$ 0,61	1,00 $\pm$ 0,61	1,63 $\pm$ 0,24	1,16 $\pm$ 0,27	0,4225	0,4225	0,4707
2	0,38 $\pm$ 0,24	1,75 $\pm$ 0,92	3,50 $\pm$ 2,34	0,38 $\pm$ 0,13	1,50 $\pm$ 0,66	0,5187	0,5919	0,0172
3	3,38 $\pm$ 3,21	2,25 $\pm$ 1,09	1,50 $\pm$ 1,02	1,25 $\pm$ 0,52	2,09 $\pm$ 0,83	0,6715	0,7450	0,7694
4	2,25 $\pm$ 1,31	1,50 $\pm$ 1,50	4,50 $\pm$ 3,52	0,25 $\pm$ 0,25	2,13 $\pm$ 0,99	0,8662	0,0467	0,4194
5	0,50 $\pm$ 0,29	1,50 $\pm$ 1,50	2,25 $\pm$ 1,44	0,00 $\pm$ 0,00	1,06 $\pm$ 0,52	1,0000	0,3279	0,1805
6	1,13 $\pm$ 0,43	3,13 $\pm$ 2,48	17,38 $\pm$ 7,55	9,38 $\pm$ 6,96	7,75 $\pm$ 2,87	0,0701	0,6834	0,4151
7	0,50 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,58	5,38 $\pm$ 3,42	2,50 $\pm$ 0,87	2,47 $\pm$ 0,93	0,0610	0,8940	0,2269
8	0,13 $\pm$ 0,13	1,13 $\pm$ 0,63	0,25 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,24	0,59 $\pm$ 0,19	0,8604	0,0130	0,6450
9	0,25 $\pm$ 0,14	0,63 $\pm$ 0,63	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,35	0,47 $\pm$ 0,19	0,7688	0,0835	0,2049
10	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 2,07	0,38 $\pm$ 0,24	0,94 $\pm$ 0,55	0,1446	0,5655	0,0807
11	0,38 $\pm$ 0,24	1,13 $\pm$ 0,83	2,93 $\pm$ 1,36	1,00 $\pm$ 0,54	1,36 $\pm$ 0,45	0,1488	0,5859	0,1798
12	0,38 $\pm$ 0,13	1,75 $\pm$ 1,27	1,83 $\pm$ 1,00	3,28 $\pm$ 1,25	1,81 $\pm$ 0,53	0,1502	0,2773	0,9187
13	0,25 $\pm$ 0,14	2,75 $\pm$ 2,59	1,03 $\pm$ 0,56	1,70 $\pm$ 1,28	1,43 $\pm$ 0,70	0,9317	0,3353	0,5729
14	0,13 $\pm$ 0,13	2,50 $\pm$ 2,34	1,45 $\pm$ 0,48	1,23 $\pm$ 0,45	1,33 $\pm$ 0,59	0,2848	0,4963	0,3414
15	0,25 $\pm$ 0,14	1,25 $\pm$ 0,92	3,50 $\pm$ 2,84	1,58 $\pm$ 0,68	1,64 $\pm$ 0,75	0,1953	0,7694	0,4619
16	1,63 $\pm$ 0,55	1,50 $\pm$ 1,00	3,38 $\pm$ 2,05	1,53 $\pm$ 1,01	2,01 $\pm$ 0,61	0,4897	0,1514	0,6122
17	0,50 $\pm$ 0,20	0,38 $\pm$ 0,13	1,75 $\pm$ 1,27	1,08 $\pm$ 0,43	0,93 $\pm$ 0,34	0,2345	0,7763	0,9723
18	1,25 $\pm$ 0,63	1,00 $\pm$ 0,71	5,13 $\pm$ 3,82	2,35 $\pm$ 0,96	2,43 $\pm$ 1,00	0,1930	0,6611	0,9676
19	0,75 $\pm$ 0,32	0,25 $\pm$ 0,14	2,88 $\pm$ 1,51	1,25 $\pm$ 0,14	1,28 $\pm$ 0,43	0,0465	0,2823	0,9847
20	0,38 $\pm$ 0,38	0,50 $\pm$ 0,20	1,25 $\pm$ 0,60	0,88 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,20	0,1089	0,9302	0,5001
21	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,58	0,63 $\pm$ 0,13	0,47 $\pm$ 0,17	0,0510	0,8487	0,8487
22	1,88 $\pm$ 1,39	0,13 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,84	0,25 $\pm$ 0,25	0,81 $\pm$ 0,41	0,7153	0,1209	0,5431
Média	0,79 $\pm$ 0,18	1,28 $\pm$ 0,24	2,99 $\pm$ 0,58	1,56 $\pm$ 0,36	1,65 $\pm$ 0,19	0,1053	0,5134	0,1980

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0046

Tempo X Insulação = 0,0350

Tempo X bST = 0,7266

Tempo X Insulação X bST = 0,6638

Gráfico 16 – Ocorrência de cauda dobrada com gota em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Durante a fase pré-insulação a ocorrência média de espermatozóides com **cabeças isoladas normais** para os dezesseis touros variou entre $2,13 \pm 0,59\%$ e $4,50 \pm 1,50\%$, como indicado na tabela 24. Dois dias após o término da insulação (semana 6), foi notado aumento nas taxas de ocorrência desse defeito nos animais dos grupos INSUL e lbST, culminando em pico na semana 7 (9 dias após o final da insulação) da ordem de $27,63 \pm 13,98\%$ para o grupo INSUL e da ordem de $38,00 \pm 19,99\%$ para o grupo lbST. O declínio foi estabelecido logo na semana 8 (16 dias após o final da insulação), porém ainda com diferença estatística significativa para as médias dos grupos INSUL e lbST quando comparados aos grupos CONT e bST nas semanas 8 e 9 ($P=0,0315$ e $P=0,0077$). O sêmen dos animais dos grupos INSUL e lbST apresentou retorno aos níveis normais na semana 11 (37 dias após o final da insulação), efeito este que pode ser observado no perfil traçado no gráfico 17.

Na tabela 25 são apontados os resultados de espermatozóides com **implantação abaxial, retroaxial ou oblíqua**. Pode-se observar que estes também não foram defeitos de magnitude, uma vez que as médias apresentadas pelos grupos ao longo das 22 semanas foram de $0,61 \pm 0,14\%$ para o grupo CONT, de $0,83 \pm 0,16\%$ para o grupo bST, de $1,12 \pm 0,21\%$ para o grupo INSUL e de $1,40 \pm 0,19\%$ para o grupo lbST. Houve efeito de tempo e de tempo X insulação sobre os resultados dessa variável ($P=0,0023$ e $P=0,0001$, respectivamente).

Durante as semanas 7, 8 e 9 houve efeito significativo da insulação, de modo que resultados dos animais dos grupos INSUL e lbST foram estatisticamente superiores aos dos grupos CONT e bST. O pico de anomalias de implantação de cauda ocorreu na semana 8 (16 dias após a insulação) no grupo INSUL e na semana 10 (30 dias após a insulação) para o grupo lbST, sendo que as maiores taxas expressas foram de $6,25 \pm 1,90\%$ para INSUL e de $2,88 \pm 1,64\%$ para lbST. O

declínio dessas patologias foi mais abrupto para o primeiro grupo e mais lento para o segundo, de forma que, à semana 13, os níveis de patologia para os grupos INSUL e IbST se aproximaram dos níveis apresentados pré-insulação, como demonstra o gráfico 18.

Tabela 24 – Ocorrência de cabeças isoladas normais em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozóides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	2,00 $\pm$ 1,02	2,38 $\pm$ 1,74	3,75 $\pm$ 2,18	4,88 $\pm$ 1,30	3,25 $\pm$ 0,78	0,2266	0,6577	0,8240
2	4,38 $\pm$ 2,96	5,75 $\pm$ 3,93	5,13 $\pm$ 4,15	2,75 $\pm$ 1,45	4,50 $\pm$ 1,50	0,4154	0,7131	0,1885
3	4,50 $\pm$ 3,69	4,13 $\pm$ 2,60	1,88 $\pm$ 0,80	3,50 $\pm$ 0,84	3,50 $\pm$ 1,07	0,5414	0,8126	0,7052
4	2,75 $\pm$ 2,75	3,25 $\pm$ 1,89	3,00 $\pm$ 1,78	2,75 $\pm$ 0,63	2,94 $\pm$ 0,86	0,9334	0,9334	0,8022
5	0,50 $\pm$ 0,50	4,25 $\pm$ 1,44	2,50 $\pm$ 1,32	1,25 $\pm$ 0,25	2,13 $\pm$ 0,59	0,6496	0,2702	0,0433
6	1,88 $\pm$ 0,83	6,63 $\pm$ 3,16	5,75 $\pm$ 1,30	5,38 $\pm$ 1,91	4,91 $\pm$ 1,01	0,5276	0,3019	0,2316
7	0,75 $\pm$ 0,14	2,88 $\pm$ 1,39	27,63 $\pm$ 13,98	38,00 $\pm$ 19,99	17,31 $\pm$ 6,84	0,0162	0,5667	0,7039
8	0,75 $\pm$ 0,32	4,00 $\pm$ 1,96	17,63 $\pm$ 13,64	28,00 $\pm$ 9,10	12,59 $\pm$ 4,65	0,0315	0,4186	0,6680
9	0,50 $\pm$ 0,20	4,25 $\pm$ 3,43	15,75 $\pm$ 7,12	20,50 $\pm$ 5,12	10,25 $\pm$ 2,98	0,0077	0,3812	0,9161
10	1,25 $\pm$ 0,75	4,13 $\pm$ 1,71	6,88 $\pm$ 3,73	13,63 $\pm$ 10,20	6,47 $\pm$ 2,74	0,1919	0,3926	0,7261
11	0,80 $\pm$ 0,55	7,75 $\pm$ 4,21	4,13 $\pm$ 0,90	3,63 $\pm$ 0,83	4,09 $\pm$ 1,17	0,8311	0,1441	0,0972
12	1,38 $\pm$ 0,24	4,75 $\pm$ 3,15	10,15 $\pm$ 8,31	7,08 $\pm$ 1,57	5,84 $\pm$ 2,18	0,2803	0,9759	0,5212
13	0,50 $\pm$ 0,35	4,38 $\pm$ 1,63	2,98 $\pm$ 0,06	8,40 $\pm$ 3,55	4,06 $\pm$ 1,15	0,1542	0,0531	0,7193
14	6,88 $\pm$ 4,55	12,75 $\pm$ 9,59	5,98 $\pm$ 2,85	5,48 $\pm$ 0,76	7,77 $\pm$ 2,58	0,4428	0,6104	0,5468
15	4,00 $\pm$ 1,46	10,88 $\pm$ 4,56	6,75 $\pm$ 2,93	3,83 $\pm$ 0,76	6,36 $\pm$ 1,46	0,4927	0,5277	0,1376
16	2,88 $\pm$ 1,60	8,63 $\pm$ 5,61	2,50 $\pm$ 1,37	1,53 $\pm$ 0,63	3,88 $\pm$ 1,53	0,2142	0,4154	0,2599
17	4,25 $\pm$ 2,77	16,50 $\pm$ 14,19	4,75 $\pm$ 3,28	1,85 $\pm$ 0,41	6,84 $\pm$ 3,63	0,3425	0,5245	0,3112
18	2,13 $\pm$ 0,72	5,25 $\pm$ 3,26	2,50 $\pm$ 1,10	3,93 $\pm$ 1,25	3,45 $\pm$ 0,89	0,8056	0,2557	0,6609
19	3,63 $\pm$ 2,20	8,00 $\pm$ 5,78	9,13 $\pm$ 4,77	3,75 $\pm$ 2,17	6,13 $\pm$ 1,92	0,8468	0,8771	0,1552
20	1,38 $\pm$ 0,55	4,13 $\pm$ 1,64	4,12 $\pm$ 3,34	2,00 $\pm$ 0,74	2,91 $\pm$ 0,92	0,8782	0,8782	0,2499
21	1,63 $\pm$ 0,85	2,88 $\pm$ 1,03	2,00 $\pm$ 1,68	2,75 $\pm$ 0,75	2,31 $\pm$ 0,53	0,9056	0,3547	0,8128
22	2,75 $\pm$ 1,61	2,88 $\pm$ 2,07	3,25 $\pm$ 1,96	6,13 $\pm$ 2,37	3,75 $\pm$ 0,97	0,2442	0,3448	0,3846
Média	2,34 $\pm$ 0,39	5,93 $\pm$ 0,95	6,73 $\pm$ 1,18	7,77 $\pm$ 1,41	5,69 $\pm$ 0,54	0,1655	0,2920	0,5529

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0003

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,9706

Tempo X Insulação X bST = 0,8098

Gráfico 17 – Ocorrência de cabeças isoladas normais em espermatozóides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,0003 Tempo X Insulação: 0,0001 Tempo X bST: 0,9706 Tempo X Insulação X bST: 0,8098

Tabela 25 – Ocorrência de implantações abaxiais, retroaxiais ou oblíquas em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,47	0,13 $\pm$ 0,13	1,75 $\pm$ 1,01	0,69 $\pm$ 0,31	0,3037	0,0570	0,2058
2	0,63 $\pm$ 0,31	1,00 $\pm$ 0,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	0,47 $\pm$ 0,18	0,0589	0,3514	0,8486
3	0,13 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,31	0,22 $\pm$ 0,10	0,1130	0,3196	0,1130
4	2,50 $\pm$ 2,50	1,50 $\pm$ 1,19	0,50 $\pm$ 0,29	0,25 $\pm$ 0,25	1,19 $\pm$ 0,67	0,1715	0,5817	0,7396
5	2,00 $\pm$ 1,41	1,75 $\pm$ 1,75	0,75 $\pm$ 0,75	1,25 $\pm$ 0,95	1,44 $\pm$ 0,58	0,4016	0,9027	0,7147
6	0,38 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,24	0,38 $\pm$ 0,24	0,31 $\pm$ 0,10	0,5086	0,5086	0,5086
7	0,38 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,24	2,88 $\pm$ 0,97	2,13 $\pm$ 0,43	1,44 $\pm$ 0,37	0,0021	0,4709	0,4709
8	0,38 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,60	6,25 $\pm$ 1,90	2,75 $\pm$ 0,66	2,53 $\pm$ 0,76	0,0019	0,1192	0,0615
9	0,38 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	3,88 $\pm$ 1,85	2,50 $\pm$ 0,96	1,69 $\pm$ 0,62	0,0108	0,3744	0,6063
10	0,63 $\pm$ 0,38	0,50 $\pm$ 0,29	2,13 $\pm$ 0,52	2,88 $\pm$ 1,64	1,53 $\pm$ 0,48	0,0765	0,7543	0,6621
11	0,25 $\pm$ 0,25	0,38 $\pm$ 0,38	1,20 $\pm$ 0,18	2,00 $\pm$ 0,79	0,96 $\pm$ 0,28	0,0176	0,3249	0,4667
12	0,25 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,48	2,13 $\pm$ 1,30	1,28 $\pm$ 0,97	1,10 $\pm$ 0,42	0,1027	0,7971	0,3336
13	0,13 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,24	0,70 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,92	0,65 $\pm$ 0,25	0,1545	0,3801	0,6723
14	0,38 $\pm$ 0,38	1,38 $\pm$ 0,55	0,38 $\pm$ 0,24	1,05 $\pm$ 1,05	0,79 $\pm$ 0,30	0,7729	0,1597	0,7729
15	0,25 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,24	0,38 $\pm$ 0,38	1,08 $\pm$ 1,08	0,52 $\pm$ 0,28	0,6280	0,8558	0,6128
16	0,50 $\pm$ 0,20	0,38 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,13	1,08 $\pm$ 1,08	0,52 $\pm$ 0,27	0,2197	0,9070	0,2743
17	0,50 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 0,35	0,50 $\pm$ 0,20	1,23 $\pm$ 1,06	0,81 $\pm$ 0,28	0,8378	0,2807	0,8378
18	0,50 $\pm$ 0,29	2,75 $\pm$ 1,55	0,13 $\pm$ 0,13	1,48 $\pm$ 1,00	1,21 $\pm$ 0,49	0,3255	0,0494	0,5844
19	0,50 $\pm$ 0,50	1,38 $\pm$ 0,90	0,50 $\pm$ 0,29	1,38 $\pm$ 1,05	0,94 $\pm$ 0,35	1,0000	0,2039	1,0000
20	0,75 $\pm$ 0,48	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,24	1,13 $\pm$ 0,97	0,56 $\pm$ 0,27	0,4739	1,0000	0,1692
21	0,63 $\pm$ 0,63	1,50 $\pm$ 1,17	0,75 $\pm$ 0,14	1,13 $\pm$ 0,97	1,00 $\pm$ 0,38	0,8758	0,4421	0,7551
22	1,25 $\pm$ 0,60	1,38 $\pm$ 0,94	0,50 $\pm$ 0,29	1,75 $\pm$ 1,18	1,22 $\pm$ 0,39	0,8047	0,3748	0,4644
Média	0,61 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,16	1,12 $\pm$ 0,21	1,40 $\pm$ 0,19	0,99 $\pm$ 0,09	0,0585	0,3475	0,9076

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0023

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,2763

Tempo X Insulação X bST = 0,5964

Gráfico 18 – Ocorrência de implantações abaxiais, retroaxiais ou oblíquas em espermatozoides de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Relativamente aos níveis de ocorrência de **caudas dobradas ou enroladas** houve efeito de tempo ($P=0,0005$) sobre os resultados, porém não foi constatado efeito de tempo X insulação, de tempo X bST, nem de tempo X insulação X bST. As médias semanais no período pré-insulação variaram entre $0,69 \pm 0,23\%$ e $1,31 \pm 0,41\%$, de modo que imediatamente antes do estabelecimento da insulação testicular o nível médio desse defeito morfológico para os dezesseis touros era de $1,19 \pm 0,31\%$.

Numericamente, houve um acréscimo nos índices dessas patologias para todos os grupos a partir da semana 8, conforme pode ser observado na tabela 26. A fase de tratamento com bST (semanas 10 a 17) apresentou uma série de oscilações nos resultados de todos os grupos, impossibilitando o estabelecimento de uma relação matemática entre causa e efeito, quando avaliados os efeitos de tratamento e os efeitos das interações. Nessa fase, os valores para o grupo CONT oscilaram entre $1,00 \pm 0,35\%$ e $3,25 \pm 0,72\%$; para o grupo bST entre $1,25 \pm 0,63\%$ e $8,88 \pm 7,71\%$; para o grupo INSUL entre $3,75 \pm 0,85\%$ e $9,63 \pm 5,01\%$ e para o grupo lbST entre $2,70 \pm 0,79\%$ e $8,03 \pm 3,25\%$. Ao final do experimento, na semana 22, os níveis médios de cauda dobrada ou enrolada eram de $2,00 \pm 1,14\%$ para o CONT, de $2,88 \pm 1,42\%$ para o bST, de $2,25 \pm 0,60\%$ para o INSUL e de $3,13 \pm 1,78\%$ para o lbST.

Os resultados de **gota protoplasmática distal** não sofreram efeito de tempo ($P=0,1530$), de tempo X insulação ($P=0,0865$), de tempo X bST ($P=0,3913$), nem de tempo X insulação X bST ($P=0,7929$). Oscilações nos níveis dessa patologia podem ser notadas para todos os grupos e em todas as fases experimentais, cujos valores estão expressos na tabela 27.

Tabela 26 – Ocorrência de cauda dobrada ou enrolada em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,13 $\pm$ 0,13	1,13 $\pm$ 0,72	1,00 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,20	0,69 $\pm$ 0,23	0,7763	0,5726	0,1129
2	1,38 $\pm$ 0,72	1,50 $\pm$ 1,19	0,63 $\pm$ 0,47	1,75 $\pm$ 1,01	1,31 $\pm$ 0,41	0,8001	0,5306	0,6144
3	0,75 $\pm$ 0,75	0,88 $\pm$ 0,52	0,88 $\pm$ 0,52	0,38 $\pm$ 0,24	0,72 $\pm$ 0,25	0,8760	0,8760	0,4111
4	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,09	0,1173	0,1173	0,1173
5	1,00 $\pm$ 0,58	1,25 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,96	1,00 $\pm$ 0,71	1,19 $\pm$ 0,31	0,8579	0,8579	0,5938
6	1,00 $\pm$ 0,41	0,75 $\pm$ 0,43	0,38 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,17	0,5192	0,7450	0,3406
7	0,38 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,24	1,38 $\pm$ 0,75	0,50 $\pm$ 0,35	0,78 $\pm$ 0,22	0,4893	0,6755	0,1472
8	1,13 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,46	0,63 $\pm$ 0,24	1,25 $\pm$ 0,78	1,00 $\pm$ 0,22	0,7509	0,5291	0,3518
9	1,88 $\pm$ 0,43	1,63 $\pm$ 0,85	4,88 $\pm$ 1,53	3,00 $\pm$ 1,02	2,84 $\pm$ 0,57	0,0725	0,3490	0,4693
10	1,38 $\pm$ 0,38	1,88 $\pm$ 0,63	5,13 $\pm$ 4,30	4,13 $\pm$ 1,48	3,13 $\pm$ 1,11	0,1923	0,9091	0,7327
11	2,75 $\pm$ 0,25	5,50 $\pm$ 4,17	7,25 $\pm$ 3,22	7,88 $\pm$ 2,76	5,84 $\pm$ 1,43	0,2846	0,5901	0,7332
12	1,00 $\pm$ 0,35	2,63 $\pm$ 1,97	5,63 $\pm$ 2,30	8,03 $\pm$ 3,25	4,32 $\pm$ 1,22	0,0654	0,4216	0,8748
13	1,38 $\pm$ 0,63	8,88 $\pm$ 7,71	3,75 $\pm$ 0,85	5,53 $\pm$ 1,92	4,88 $\pm$ 1,93	0,3017	0,3836	0,6408
14	1,25 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 5,71	8,50 $\pm$ 3,30	5,55 $\pm$ 2,22	5,42 $\pm$ 1,70	0,3981	0,7708	0,2938
15	1,13 $\pm$ 0,38	5,88 $\pm$ 4,06	5,13 $\pm$ 1,43	5,83 $\pm$ 2,00	4,49 $\pm$ 1,18	0,4462	0,3003	0,4352
16	1,75 $\pm$ 0,43	3,25 $\pm$ 1,71	6,63 $\pm$ 1,30	2,70 $\pm$ 0,79	3,58 $\pm$ 0,71	0,1092	0,3449	0,0527
17	3,25 $\pm$ 0,72	1,25 $\pm$ 0,63	9,63 $\pm$ 5,01	3,48 $\pm$ 0,81	4,40 $\pm$ 1,41	0,1548	0,1752	0,4727
18	1,38 $\pm$ 1,21	1,25 $\pm$ 0,75	4,38 $\pm$ 3,10	3,23 $\pm$ 1,73	2,56 $\pm$ 0,92	0,1486	0,9573	0,8072
19	1,38 $\pm$ 0,47	1,50 $\pm$ 1,02	1,63 $\pm$ 0,43	1,63 $\pm$ 0,83	1,53 $\pm$ 0,33	0,8169	0,9384	0,9384
20	1,25 $\pm$ 0,52	1,38 $\pm$ 0,80	2,50 $\pm$ 1,54	1,25 $\pm$ 0,52	1,59 $\pm$ 0,44	0,5360	0,5360	0,4519
21	1,75 $\pm$ 0,72	1,25 $\pm$ 0,75	5,00 $\pm$ 2,18	2,25 $\pm$ 1,03	2,56 $\pm$ 0,70	0,0706	0,1514	0,3060
22	2,00 $\pm$ 1,14	2,88 $\pm$ 1,42	2,25 $\pm$ 0,60	3,13 $\pm$ 1,78	2,56 $\pm$ 0,60	0,8199	0,4331	1,0000
Média	1,33 $\pm$ 0,13	2,40 $\pm$ 0,53	3,60 $\pm$ 0,49	2,90 $\pm$ 0,37	2,55 $\pm$ 0,21	0,1036	0,8098	0,2764

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0005

Tempo X Insulação = 0,5289

Tempo X bST = 0,4968

Tempo X Insulação X bST = 0,8918

Tabela 27 – Ocorrência de gota protoplasmática distal em porcentagem ($\pm$ EPM) em espermatozoides de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,88 $\pm$ 0,59	5,00 $\pm$ 4,21	2,25 $\pm$ 0,83	1,38 $\pm$ 0,80	2,38 $\pm$ 1,07	0,8307	0,8979	0,3442
2	1,13 $\pm$ 0,66	0,88 $\pm$ 0,88	0,75 $\pm$ 0,32	0,25 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,27	0,6155	0,3541	0,9227
3	0,13 $\pm$ 0,13	4,88 $\pm$ 4,55	1,63 $\pm$ 1,18	1,75 $\pm$ 0,83	2,09 $\pm$ 1,16	0,4895	0,2073	0,4350
4	0,50 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 1,00	0,75 $\pm$ 0,48	1,75 $\pm$ 0,75	1,00 $\pm$ 0,33	0,3420	0,4219	0,5360
5	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,50 $\pm$ 0,87	7,00 $\pm$ 4,95	2,38 $\pm$ 1,34	0,1252	0,3547	0,8873
6	3,63 $\pm$ 2,21	4,88 $\pm$ 3,71	1,13 $\pm$ 0,66	5,38 $\pm$ 4,06	3,75 $\pm$ 1,40	0,5744	0,4009	0,5302
7	1,63 $\pm$ 0,80	3,63 $\pm$ 2,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,25	1,38 $\pm$ 0,74	0,0596	0,7042	0,9540
8	0,13 $\pm$ 0,13	2,63 $\pm$ 2,01	0,38 $\pm$ 0,38	0,50 $\pm$ 0,29	0,91 $\pm$ 0,53	0,6094	0,2450	0,3908
9	0,25 $\pm$ 0,25	1,25 $\pm$ 0,78	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,13	0,41 $\pm$ 0,22	0,1190	0,2009	0,3933
10	1,00 $\pm$ 0,35	2,75 $\pm$ 2,59	0,75 $\pm$ 0,48	1,75 $\pm$ 1,03	1,56 $\pm$ 0,67	0,8571	0,6949	0,7947
11	0,88 $\pm$ 0,31	1,88 $\pm$ 1,09	1,83 $\pm$ 0,42	2,00 $\pm$ 1,24	1,64 $\pm$ 0,40	0,4983	0,8497	0,4858
12	0,38 $\pm$ 0,24	1,50 $\pm$ 0,87	0,38 $\pm$ 0,24	1,95 $\pm$ 0,61	1,05 $\pm$ 0,31	0,6095	0,0364	0,6095
13	0,38 $\pm$ 0,24	1,75 $\pm$ 0,97	0,38 $\pm$ 0,13	1,50 $\pm$ 0,71	1,00 $\pm$ 0,32	0,9859	0,0545	0,9188
14	0,50 $\pm$ 0,35	0,25 $\pm$ 0,14	1,33 $\pm$ 1,23	0,83 $\pm$ 0,20	0,73 $\pm$ 0,31	0,2740	0,9090	0,6918
15	0,50 $\pm$ 0,20	0,13 $\pm$ 0,13	1,63 $\pm$ 1,30	4,20 $\pm$ 1,47	1,61 $\pm$ 0,60	0,0140	0,3442	0,0786
16	0,75 $\pm$ 0,32	0,63 $\pm$ 0,47	2,50 $\pm$ 1,43	5,33 $\pm$ 3,23	2,30 $\pm$ 0,94	0,1526	0,8248	0,6254
17	3,00 $\pm$ 0,89	0,38 $\pm$ 0,13	1,50 $\pm$ 0,84	1,38 $\pm$ 0,43	1,56 $\pm$ 0,38	0,9432	0,0267	0,0190
18	2,38 $\pm$ 1,31	1,50 $\pm$ 1,19	0,88 $\pm$ 0,43	1,83 $\pm$ 1,23	1,64 $\pm$ 0,51	0,7796	0,9124	0,4760
19	0,50 $\pm$ 0,35	0,25 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 1,70	2,88 $\pm$ 2,88	1,53 $\pm$ 0,81	0,2535	0,6218	0,8384
20	1,38 $\pm$ 0,52	0,38 $\pm$ 0,38	5,63 $\pm$ 5,30	1,63 $\pm$ 0,38	2,25 $\pm$ 1,30	0,3177	0,4977	0,5230
21	2,50 $\pm$ 0,74	0,25 $\pm$ 0,14	1,63 $\pm$ 0,97	1,63 $\pm$ 0,55	1,50 $\pm$ 0,37	0,6249	0,1330	0,0945
22	1,75 $\pm$ 1,03	0,50 $\pm$ 0,29	3,38 $\pm$ 2,26	1,63 $\pm$ 1,14	1,81 $\pm$ 0,67	0,3620	0,3306	0,9904
Média	1,10 $\pm$ 0,17	1,69 $\pm$ 0,39	1,48 $\pm$ 0,30	2,13 $\pm$ 0,38	1,60 $\pm$ 0,16	0,4108	0,5722	0,6516

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,1530

Tempo X Insulação = 0,0865

Tempo X bST = 0,3913

Tempo X Insulação X bST = 0,7929

Os **defeitos maiores** dos espermatozóides são representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal e contorno anormal de cabeça), defeitos de peça intermediária (fibrilação, fratura total, fratura parcial, edema e pseudogotas), defeitos de cauda (cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa), além de defeitos de acrossomo, *pouch formation* e gota protoplasmática proximal. A somatória da ocorrência desses defeitos contados em uma amostra do ejaculado resulta em um índice denominado “**total de defeitos maiores**”.

A média semanal relativa ao total de defeitos maiores nos ejaculados de dezesseis touros antes do início da insulação testicular oscilou entre $6,50 \pm 1,32\%$ e $7,63 \pm 1,48\%$, de modo que este último valor foi obtido imediatamente antes do início da insulação (semana 5), como demonstrado na tabela 28. Foram significativos os efeitos de tempo ($P=0,0016$) e de tempo X insulação ($P=0,0001$) sobre o total de defeitos maiores.

Diferentemente do quadro de similaridade apresentado pelos grupos durante a fase pré-insulação do experimento, na semana 6 (apenas 2 dias após o final da insulação) o total de defeitos maiores no grupo CONT era de $8,25 \pm 4,99\%$, no grupo bST era de $9,63 \pm 4,90\%$, no grupo INSUL era de $46,75 \pm 11,42\%$ e no grupo lbST era de $27,00 \pm 11,38\%$, caracterizando significativo efeito da insulação sobre os resultados ($P=0,0086$). As diferenças na análise de variância se mantiveram consecutivamente consistentes entre as semanas 6 e 12, com maiores níveis de defeitos totais ocorrendo sempre nos animais dos grupos INSUL e lbST.

Na semana 9 (23 dias após o final da insulação) ocorreu o pico de defeitos maiores tanto nos grupos INSUL quanto IbST. Naquela semana, os grupos INSUL e IbST atingiram valores de $54,25 \pm 5,79\%$ e $47,63 \pm 10,26\%$, enquanto os grupos CONT e bST apresentaram valores de $5,63 \pm 2,68\%$ e $4,13 \pm 2,99\%$, respectivamente. A diferença ocasionada pelo efeito da insulação foi altamente significativa ($P < 0,0001$).

Os valores de defeitos maiores totais se mantiveram semelhantes e de pequena grandeza para os grupos CONT e bST ao longo de todas as fases do experimento, sendo que em 17 de 22 amostras do grupo CONT e em 14 de 22 amostras do grupo bST o total de defeitos maiores não ultrapassou a barreira dos 10%. Durante a fase de pós-tratamento (semanas 18 a 22) houve um ligeiro acréscimo dos valores nos grupos CONT e bST, com expressão de pequenos e eventuais picos de anomalias que atingiram $12,75 \pm 5,26\%$ no grupo CONT e $20,25 \pm 17,25\%$ no grupo bST.

Apesar do nítido efeito exercido pela insulação sobre os resultados dos grupos INSUL e IbST durante as fases pré-tratamento e tratamento, e do ligeiro incremento já descrito nos resultados dos grupos CONT e bST, a estabilização do quadro de defeitos maiores se deu definitivamente na semana 15, a partir da qual não foi observada mais nenhuma diferença estatística significativa entre os resultados dos animais dos grupos CONT, bST, INSUL e IbST.

A média final de defeitos maiores após 22 semanas de experimentação foi de $7,12 \pm 0,82\%$ para o grupo CONT, de $9,75 \pm 1,43\%$ para o grupo bST, de $17,37 \pm 1,89\%$ para o grupo INSUL e de $21,02 \pm 2,50\%$ para o grupo IbST. O perfil do total de defeitos maiores pode ser observado no gráfico 19.

Tabela 28 – Total de defeitos maiores em porcentagem ($\pm$ EPM) em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	6,00 $\pm$ 2,71	6,00 $\pm$ 1,34	5,13 $\pm$ 0,55	12,25 $\pm$ 3,34	7,34 $\pm$ 1,25	0,2932	0,1731	0,1731
2	5,50 $\pm$ 1,51	8,75 $\pm$ 3,92	7,00 $\pm$ 3,52	5,50 $\pm$ 1,50	6,69 $\pm$ 1,32	0,6909	0,6909	0,2939
3	6,63 $\pm$ 3,18	7,75 $\pm$ 4,28	6,50 $\pm$ 3,31	7,38 $\pm$ 1,90	7,06 $\pm$ 1,47	0,9299	0,7258	0,9649
4	7,75 $\pm$ 3,20	5,00 $\pm$ 2,38	8,75 $\pm$ 3,75	4,50 $\pm$ 0,87	6,50 $\pm$ 1,32	0,8904	0,0785	0,6807
5	9,00 $\pm$ 2,86	9,75 $\pm$ 4,29	6,50 $\pm$ 2,36	5,25 $\pm$ 2,72	7,63 $\pm$ 1,48	0,0336	0,8619	0,4922
6	8,25 $\pm$ 4,99	9,63 $\pm$ 4,90	46,75 $\pm$ 11,42	27,00 $\pm$ 11,38	22,91 $\pm$ 5,63	0,0086	0,2996	0,2375
7	6,63 $\pm$ 3,50	7,63 $\pm$ 3,58	27,88 $\pm$ 4,96	34,63 $\pm$ 16,70	19,19 $\pm$ 5,15	0,0201	0,6614	0,7446
8	2,50 $\pm$ 1,41	5,13 $\pm$ 2,65	51,38 $\pm$ 12,64	30,13 $\pm$ 9,31	22,28 $\pm$ 6,27	0,0009	0,2552	0,1537
9	5,63 $\pm$ 2,68	4,13 $\pm$ 2,99	54,25 $\pm$ 5,79	47,63 $\pm$ 10,26	27,91 $\pm$ 6,60	< 0,0001	0,5521	0,7059
10	4,38 $\pm$ 2,18	7,13 $\pm$ 3,14	37,00 $\pm$ 3,49	25,50 $\pm$ 8,70	18,50 $\pm$ 4,14	0,0010	0,4335	0,2146
11	4,25 $\pm$ 1,98	8,13 $\pm$ 2,95	22,50 $\pm$ 3,38	23,00 $\pm$ 15,04	14,47 $\pm$ 4,15	0,0519	0,7741	0,8246
12	3,45 $\pm$ 0,41	8,13 $\pm$ 4,56	20,53 $\pm$ 1,82	28,98 $\pm$ 13,17	15,27 $\pm$ 4,08	0,0109	0,2977	0,7578
13	2,63 $\pm$ 0,24	10,50 $\pm$ 6,91	10,73 $\pm$ 3,27	23,85 $\pm$ 14,70	11,93 $\pm$ 4,19	0,1775	0,1858	0,7285
14	3,13 $\pm$ 1,16	6,38 $\pm$ 3,74	9,10 $\pm$ 0,60	22,95 $\pm$ 15,00	10,39 $\pm$ 3,98	0,0114	0,4289	0,4765
15	5,13 $\pm$ 0,80	13,38 $\pm$ 10,09	7,88 $\pm$ 2,54	24,15 $\pm$ 14,57	12,63 $\pm$ 4,43	0,3953	0,1400	0,6092
16	7,38 $\pm$ 2,13	13,75 $\pm$ 10,75	7,00 $\pm$ 2,88	20,78 $\pm$ 15,64	12,23 $\pm$ 4,56	0,6998	0,2584	0,6682
17	11,00 $\pm$ 5,51	6,63 $\pm$ 4,17	6,75 $\pm$ 1,45	20,53 $\pm$ 15,70	11,23 $\pm$ 4,12	0,5582	0,5683	0,2824
18	9,38 $\pm$ 3,14	14,88 $\pm$ 10,11	13,00 $\pm$ 5,78	24,25 $\pm$ 14,47	15,38 $\pm$ 4,44	0,4379	0,3229	0,7279
19	10,75 $\pm$ 6,29	12,50 $\pm$ 8,87	8,75 $\pm$ 3,49	20,63 $\pm$ 15,64	13,16 $\pm$ 4,48	0,7099	0,4151	0,5414
20	12,75 $\pm$ 8,13	20,25 $\pm$ 17,25	9,50 $\pm$ 4,32	16,50 $\pm$ 10,89	14,75 $\pm$ 5,11	0,7009	0,4326	0,9780
21	12,38 $\pm$ 8,80	16,00 $\pm$ 13,35	7,75 $\pm$ 2,59	21,63 $\pm$ 18,46	14,44 $\pm$ 6,65	0,9623	0,4173	0,6305
22	12,25 $\pm$ 5,26	13,13 $\pm$ 8,99	7,50 $\pm$ 2,16	15,38 $\pm$ 8,92	12,06 $\pm$ 3,19	0,8305	0,4603	0,5525
Média	7,12 $\pm$ 0,82	9,75 $\pm$ 1,43	17,37 $\pm$ 1,89	21,02 $\pm$ 2,50	13,81 $\pm$ 0,93	0,0273	0,4623	0,9034

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0016

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,3093

Tempo X Insulação X bST = 0,5393

Gráfico 19 – Total de defeitos maiores em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Os **defeitos menores** dos espermatozóides são representados pelas seguintes anomalias morfológicas: patologias de cabeça (cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal), defeitos de implantação (abaxial, retroaxial, oblíqua), defeitos de cauda (cauda dobrada, cauda enrolada) e gota protoplasmática distal. A somatória da ocorrência desses defeitos contados em uma amostra do ejaculado resulta em um índice denominado “**total de defeitos menores**”.

A média semanal relativa ao total de defeitos menores nos ejaculados de dezesseis touros antes do início da insulação testicular oscilou entre $5,25 \pm 1,52\%$ e $7,13 \pm 1,46\%$, de modo que este maior valor foi constatado na semana 5 (imediatamente antes do início da insulação), como indicado na tabela 29. Para o total de defeitos menores foram significativos os efeitos de tempo ($P=0,0001$) e de tempo X insulação ($P=0,0001$).

Durante a fase de pré-tratamento, mais especificamente durante a semana 6 (2 dias após o final da insulação), houve um leve aumento nas taxas de defeitos menores apresentados pelos grupos CONT, bST, INSUL e IbST. Na semana seguinte este efeito foi revertido nos animais dos grupos CONT e bST, todavia foi agravado nos animais dos grupos INSUL e IbST, de modo que estes apresentaram durante a semana 7 (9 dias após o término da insulação) um grande pico de defeitos menores da ordem de $31,88 \pm 13,48\%$ (INSUL) e de $40,88 \pm 20,08\%$ (IbST). Este perfil pode ser observado no gráfico 20.

Após o pico de defeitos menores, os níveis desse grupo de patologias foram recuando paulatinamente nos grupos INSUL e IbST, mas até a semana 13 (com exceção feita à semana 11) ainda havia diferenças significativas entre os animais insulados e os não insulados. Da semana 14 até o final da fase pós-tratamento (58 a

114 dias após o final da insulação) não foi mais detectada qualquer diferença nos resultados apresentados pelos grupos CONT, bST, INSUL e lbST que pudesse ser creditada ao efeito da insulação.

Interessante notar que da semana 14 em diante, apesar das oscilações demonstradas, os resultados dos quatro grupos seguiram um perfil muito próximo, com relativo paralelismo entre aumentos e decréscimos de resultados. Esse fenômeno possivelmente minimizou a possibilidade de se detectar efeito significativo de insulação, de bST e suas interações.

A média final de defeitos menores após 22 semanas de experimentação foi de $5,38 \pm 0,48\%$ para o grupo CONT, de $10,85 \pm 1,37\%$ para o grupo bST, de $12,93 \pm 1,28\%$ para o grupo INSUL e de $14,19 \pm 1,43\%$ para o grupo lbST.

Tabela 29 – Total de defeitos menores em porcentagem ($\pm$ EPM) em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	3,25 $\pm$ 0,83	9,13 $\pm$ 5,97	7,13 $\pm$ 1,68	8,50 $\pm$ 1,62	7,00 $\pm$ 1,56	0,6077	0,2658	0,4802
2	7,50 $\pm$ 2,81	9,13 $\pm$ 4,86	6,50 $\pm$ 4,85	5,00 $\pm$ 1,81	7,03 $\pm$ 1,75	0,2194	0,9750	0,4416
3	5,50 $\pm$ 4,36	9,88 $\pm$ 6,78	4,50 $\pm$ 2,32	6,25 $\pm$ 1,70	6,53 $\pm$ 1,99	0,6078	0,4992	0,7697
4	5,75 $\pm$ 5,42	5,75 $\pm$ 3,66	4,75 $\pm$ 1,55	4,75 $\pm$ 0,85	5,25 $\pm$ 1,52	0,6940	1,0000	1,0000
5	3,50 $\pm$ 1,71	8,25 $\pm$ 2,87	6,25 $\pm$ 1,11	10,50 $\pm$ 4,65	7,13 $\pm$ 1,46	0,3168	0,0887	0,9179
6	6,88 $\pm$ 1,61	12,38 $\pm$ 7,33	7,63 $\pm$ 1,74	12,00 $\pm$ 4,81	9,72 $\pm$ 2,13	0,9679	0,3045	0,9040
7	3,13 $\pm$ 0,83	7,75 $\pm$ 4,44	31,88 $\pm$ 13,48	40,88 $\pm$ 20,08	20,91 $\pm$ 6,86	0,0219	0,5576	0,8493
8	2,38 $\pm$ 0,31	8,38 $\pm$ 4,50	24,88 $\pm$ 12,59	32,50 $\pm$ 8,95	17,03 $\pm$ 4,77	0,0157	0,4077	0,9198
9	3,00 $\pm$ 0,00	7,13 $\pm$ 5,00	24,50 $\pm$ 7,17	26,13 $\pm$ 4,39	15,19 $\pm$ 3,43	0,0023	0,5663	0,8016
10	4,25 $\pm$ 1,05	9,25 $\pm$ 4,42	14,88 $\pm$ 4,70	22,38 $\pm$ 8,84	12,69 $\pm$ 3,01	0,0503	0,2651	0,8174
11	4,75 $\pm$ 0,72	15,50 $\pm$ 5,32	14,38 $\pm$ 2,98	15,50 $\pm$ 1,74	12,53 $\pm$ 1,84	0,1483	0,0828	0,1483
12	3,00 $\pm$ 0,65	9,63 $\pm$ 5,96	18,28 $\pm$ 6,32	18,30 $\pm$ 3,34	12,30 $\pm$ 2,67	0,0305	0,4946	0,4978
13	2,38 $\pm$ 0,55	15,38 $\pm$ 10,06	7,80 $\pm$ 0,93	16,85 $\pm$ 1,82	10,60 $\pm$ 2,75	0,0338	0,0136	0,4895
14	9,00 $\pm$ 4,10	20,75 $\pm$ 15,92	16,15 $\pm$ 5,99	12,88 $\pm$ 1,76	14,69 $\pm$ 4,09	0,9646	0,6065	0,3688
15	5,88 $\pm$ 1,66	17,25 $\pm$ 7,48	13,88 $\pm$ 2,35	14,90 $\pm$ 3,43	12,98 $\pm$ 2,24	0,5457	0,2015	0,2798
16	5,88 $\pm$ 2,05	12,88 $\pm$ 7,17	11,75 $\pm$ 2,24	10,60 $\pm$ 3,52	10,28 $\pm$ 2,03	0,6897	0,5196	0,3749
17	11,00 $\pm$ 2,30	19,13 $\pm$ 14,34	16,38 $\pm$ 4,79	7,90 $\pm$ 0,45	13,60 $\pm$ 3,61	0,6899	0,9809	0,2723
18	6,38 $\pm$ 1,57	10,75 $\pm$ 4,11	7,88 $\pm$ 3,82	10,45 $\pm$ 3,15	8,86 $\pm$ 1,55	0,8420	0,2651	0,7652
19	6,00 $\pm$ 2,74	11,13 $\pm$ 6,31	13,75 $\pm$ 6,61	9,63 $\pm$ 1,51	10,13 $\pm$ 2,28	0,4522	0,9027	0,2748
20	4,75 $\pm$ 1,20	5,88 $\pm$ 1,07	12,63 $\pm$ 6,69	6,00 $\pm$ 1,24	7,31 $\pm$ 1,76	0,2239	0,3925	0,2375
21	6,50 $\pm$ 1,87	5,88 $\pm$ 1,88	9,38 $\pm$ 3,20	7,75 $\pm$ 0,97	7,38 $\pm$ 1,02	0,2064	0,5350	0,7808
22	7,75 $\pm$ 2,50	7,63 $\pm$ 3,08	9,38 $\pm$ 2,56	12,63 $\pm$ 3,56	9,34 $\pm$ 1,42	0,1530	0,4803	0,4470
Média	5,38 $\pm$ 0,48	10,85 $\pm$ 1,37	12,93 $\pm$ 1,28	14,19 $\pm$ 1,43	10,84 $\pm$ 0,63	0,0990	0,2861	0,4964

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,8582

Tempo X Insulação X bST = 0,9417

Gráfico 20 – Total de defeitos menores em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

O **total de defeitos espermáticos** é dado pela somatória do total de defeitos maiores e do total de defeitos menores encontrados em um ejaculado. No presente experimento houve efeito do tempo ($P=0,0001$) e da interação tempo X insulação ($P=0,0001$) sobre os resultados de total de defeitos espermáticos.

A média semanal antes do início da insulação testicular oscilou entre $11,75 \pm 2,66\%$ e $14,75 \pm 2,54\%$ para os dezesseis touros do experimento, de modo que este último valor expressa a média da semana 5, a qual é o momento imediatamente anterior ao início da insulação testicular. Estes valores podem ser vistos na tabela 30.

A média de defeitos totais apresentados por cada um dos grupos durante a semana 5 foi de $12,50 \pm 4,33\%$ para o grupo CONT, de $18,00 \pm 7,11\%$ para o grupo bST, de $12,75 \pm 3,25\%$ para o grupo INSUL e de $15,75 \pm 6,50\%$ para o grupo IbST. Com a amostragem realizada na semana 6 (2 dias após o fim da insulação), pôde-se detectar expressivos acréscimos nos níveis de defeitos totais dos grupos INSUL e IbST ($P<0,05$). Entre as semanas 6 e 9, os valores apresentados pelos grupos CONT e bST tiveram certa queda (de $15,13\%$ para $8,63\%$ no grupo CONT e de $22,00\%$ para $7,98\%$ no grupo bST), enquanto os valores do grupo INSUL saltaram de $54,38\%$ para $78,75\%$ e do grupo IbST aumentaram de $39,00\%$ para $73,75\%$ no mesmo período. O pico de defeitos totais para o grupo INSUL ocorreu na semana 9 (23 dias após o final da insulação) e para o grupo IbST ocorreu na semana 7 (9 dias após o final da insulação). Estas variações estão expressas no gráfico 21.

Os defeitos totais apresentados pelos grupos INSUL e IbST foram maiores que os apresentados para os grupos CONT e bST consecutivamente entre as semanas 6 e 12 devido ao efeito da insulação. Houve uma tendência de estabilização dos níveis apresentados pelos quatro grupos após a semana 13. Na

fase pós-tratamento, compreendida pelas semanas 18 a 22, os resultados dos grupos tiveram oscilação relativamente pequena no total de defeitos, de modo que o CONT variou entre $15,75 \pm 4,52\%$ e $20,00 \pm 7,49\%$, o bST variou entre $20,75 \pm 11,53\%$ e $26,13 \pm 18,30\%$, o INSUL variou entre $16,88 \pm 3,86\%$ e $22,50 \pm 9,91\%$ e o lbST variou entre $22,50 \pm 11,96\%$ e $34,70 \pm 14,06\%$.

A ocorrência média de total de defeitos ao final das 22 semanas de experimentação foi de $12,50 \pm 1,13\%$ (CONT), de $20,60 \pm 2,45\%$ (bST), de $30,30 \pm 2,46\%$ (INSUL) e de $35,21 \pm 2,94\%$ (lbST), sendo, como já colocado, influenciada pelo efeito da insulação testicular.

Tabela 30 – Total de defeitos espermáticos em porcentagem ($\pm$ EPM) em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	9,25 $\pm$ 2,89	15,13 $\pm$ 6,99	12,25 $\pm$ 1,85	20,75 $\pm$ 4,07	14,34 $\pm$ 2,25	0,3148	0,1098	0,7533
2	13,00 $\pm$ 2,47	17,88 $\pm$ 8,68	13,50 $\pm$ 8,36	10,50 $\pm$ 3,17	13,72 $\pm$ 2,92	0,3694	0,8024	0,3073
3	12,13 $\pm$ 7,53	17,63 $\pm$ 11,04	11,00 $\pm$ 5,62	13,63 $\pm$ 2,33	13,59 $\pm$ 3,35	0,7191	0,5707	0,8397
4	13,50 $\pm$ 8,53	10,78 $\pm$ 5,85	13,50 $\pm$ 5,20	9,25 $\pm$ 1,70	11,75 $\pm$ 2,66	0,8448	0,3717	0,8448
5	12,50 $\pm$ 4,33	18,00 $\pm$ 7,11	12,75 $\pm$ 3,25	15,75 $\pm$ 6,50	14,75 $\pm$ 2,54	0,7571	0,2084	0,6995
6	15,13 $\pm$ 5,67	22,00 $\pm$ 12,23	54,38 $\pm$ 11,00	39,00 $\pm$ 16,16	32,63 $\pm$ 6,61	0,0293	0,7048	0,3326
7	9,75 $\pm$ 3,14	15,38 $\pm$ 7,89	59,75 $\pm$ 10,05	75,50 $\pm$ 12,58	40,09 $\pm$ 8,33	0,0003	0,2976	0,6132
8	4,88 $\pm$ 1,56	13,50 $\pm$ 7,12	76,25 $\pm$ 2,55	62,63 $\pm$ 6,61	39,31 $\pm$ 8,24	< 0,0001	0,6754	0,0863
9	8,63 $\pm$ 2,68	11,25 $\pm$ 7,98	78,75 $\pm$ 5,72	73,75 $\pm$ 8,29	43,09 $\pm$ 9,07	< 0,0001	0,8757	0,6178
10	8,63 $\pm$ 2,19	16,38 $\pm$ 7,56	51,88 $\pm$ 5,80	47,88 $\pm$ 10,28	31,19 $\pm$ 5,83	0,0002	0,7670	0,3635
11	9,00 $\pm$ 2,15	23,63 $\pm$ 7,91	36,88 $\pm$ 5,67	38,50 $\pm$ 14,74	27,00 $\pm$ 5,03	0,0189	0,3056	0,4074
12	6,45 $\pm$ 0,86	17,75 $\pm$ 10,45	38,75 $\pm$ 6,39	47,28 $\pm$ 12,25	27,56 $\pm$ 5,71	0,0020	0,2004	0,8510
13	5,00 $\pm$ 0,74	25,88 $\pm$ 16,94	18,50 $\pm$ 3,52	40,68 $\pm$ 13,19	22,51 $\pm$ 5,89	0,1691	0,0490	0,9467
14	12,13 $\pm$ 4,83	27,13 $\pm$ 19,63	25,25 $\pm$ 5,71	35,83 $\pm$ 14,77	25,08 $\pm$ 6,15	0,2655	0,1975	0,8151
15	11,00 $\pm$ 1,97	30,63 $\pm$ 17,21	21,75 $\pm$ 4,01	39,00 $\pm$ 13,68	25,59 $\pm$ 5,69	0,3240	0,0751	0,8997
16	13,25 $\pm$ 3,29	26,63 $\pm$ 17,73	18,75 $\pm$ 5,09	31,40 $\pm$ 15,94	22,51 $\pm$ 5,79	0,6349	0,2448	0,9731
17	22,00 $\pm$ 6,62	25,75 $\pm$ 18,50	23,13 $\pm$ 6,23	28,43 $\pm$ 16,10	24,83 $\pm$ 5,88	0,8559	0,6669	0,6409
18	15,75 $\pm$ 4,52	25,63 $\pm$ 13,95	20,88 $\pm$ 7,45	34,70 $\pm$ 14,06	24,24 $\pm$ 5,16	0,4276	0,1989	0,8224
19	16,75 $\pm$ 8,85	23,63 $\pm$ 15,00	22,50 $\pm$ 9,91	30,25 $\pm$ 15,01	23,28 $\pm$ 5,73	0,4878	0,4147	0,9603
20	17,50 $\pm$ 9,21	26,13 $\pm$ 18,30	22,13 $\pm$ 10,60	22,50 $\pm$ 11,96	22,06 $\pm$ 5,86	0,9573	0,6325	0,6608
21	18,88 $\pm$ 10,53	21,88 $\pm$ 14,24	17,13 $\pm$ 4,88	29,38 $\pm$ 17,89	21,81 $\pm$ 5,86	0,7930	0,4917	0,6739
22	20,00 $\pm$ 7,49	20,75 $\pm$ 11,53	16,88 $\pm$ 3,86	28,00 $\pm$ 12,42	21,41 $\pm$ 4,36	0,7816	0,4321	0,4906
Média	12,50 $\pm$ 1,13	20,60 $\pm$ 2,45	30,30 $\pm$ 2,49	35,21 $\pm$ 2,94	24,65 $\pm$ 1,26	0,0159	0,2645	0,7772

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,2612

Tempo X Insulação X bST = 0,8792

Gráfico 21 – Total de defeitos espermáticos em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Efeitos:
 Tempo: 0,0001 Tempo X Insulação: 0,0001 Tempo X bST: 0,2612 Tempo X Insulação X bST: 0,8792

5.7 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Conforme descrito em “Materiais e Métodos” (seção 4), para avaliação da integridade de membrana citoplasmática, integridade de membrana acrossomal e função mitocondrial, os espermatozóides foram corados com sondas fluorescentes, avaliados em microscopia de epifluorescência e cada célula classificada em uma das seguintes categorias:

- MIAl-CP: espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial.
- MIAl-SP: espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial.
- MIAL-CP: espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial.
- MIAL-SP: espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial.
- MLAI-CP: espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial.
- MLAI-SP: espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial.
- MLAL-CP: espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial.
- MLAL-SP: espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial.

Fotografias ilustrativas das diferentes categorias citadas podem ser vistas nas figuras 8, 9, 10 e 11.

Figura 8 - Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MIAI-CP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial (A) e MIAI-SP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial (B).

Figura 9 - Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MIAL-CP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial (A) e MIAL-SP, espermatozóide com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial (B).

Figura 10 - Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MLAI-CP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com potencial mitocondrial (A) e MLAI-SP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, sem potencial mitocondrial (B).

Figura 11 - Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias: MLAL-CP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com potencial mitocondrial (A) e MLAL-SP, espermatozóide com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, sem potencial mitocondrial (B).

A princípio, serão demonstrados os resultados para características de interesse de forma isolada (integridade de membrana citoplasmática, integridade de acrossomo e função mitocondrial). No final desta seção, será apresentado o resultado para a população de células classificadas como MIAI-CP, que são os espermatozóides que possuem concomitantemente membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e potencial mitocondrial, os quais consideramos serem os únicos aptos a executar o processo de fertilização após uma monta natural ou inseminação artificial.

Deste modo, é importante apresentar os índices de **espermatozóides com membrana citoplasmática lesada**. A membrana plasmática pode perder sua integridade em função de processos físicos ou químicos que desestremem sua bicamada lipídica. Como pode ser observado na tabela 31, durante as cinco primeiras semanas do período experimental (fase pré-insulação) as médias semanais de espermatozóides com membrana plasmática lesada para os dezesseis touros variaram entre $31,06 \pm 3,85\%$ e $44,19 \pm 3,98\%$. De forma complementar, deduz-se que o índice de espermatozóides com membrana citoplasmática íntegra antes do início da insulação variou entre 55,81% e 68,94%.

Na semana 5, a qual corresponde ao momento imediatamente anterior ao início da insulação testicular, os valores médios de espermatozóides com membrana citoplasmática lesada eram de $28,75 \pm 3,62\%$ para o grupo CONT, de $30,88 \pm 3,49\%$ para o grupo bST, de $41,25 \pm 4,89\%$ para o grupo INSUL e de $28,25 \pm 2,63\%$ para o grupo lbST. Conjuntamente, os dezesseis touros apresentavam naquele momento média de $32,28 \pm 2,16\%$ de espermatozóides com membrana plasmática com algum tipo de lesão.

Após a insulação testicular, os índices de células com membrana plasmática lesada sofreram considerável incremento, significativo para os touros de INSUL e IbST, como pode ser observado no gráfico 22. Esse aumento nos índices foi constatado a partir da semana 6 (2 dias após o final da insulação), de modo que os índices foram alcançando maior magnitude durante as semanas 6 a 9 (2 a 23 dias após o final da insulação), com picos de ocorrência que se expressaram na semana 9 tanto para os animais do grupo INSUL ($91,13 \pm 6,42\%$) quanto para os animais do grupo IbST ($84,75 \pm 6,75\%$). Durante as semanas 7 a 13, houve efeito significativo da insulação na diferença entre as médias dos grupos ($P < 0,05$).

O declínio dos valores iniciou na semana 10 (30 dias após o final da insulação) e ocorreu similarmente para os grupos INSUL e bST, de modo que não foi constatado efeito estatístico das aplicações do bST sobre a integridade de membrana citoplasmática dos espermatozóides durante a fase de tratamento (semanas 10 a 17), tampouco durante a fase pós-tratamento (semanas 18 a 22). À semana 17 (51 dias após o final da insulação), os índices apresentados pelos grupos eram semelhantes àqueles apresentados no início do experimento.

Interessante notar as oscilações semanais dos valores para os animais dos quatro grupos durante a pré-insulação e dos animais CONT ao longo de todo período experimental. Essas oscilações semanais, da ordem de 5 a 10% em média, podem indicar uma alta sensibilidade da técnica para a detecção de anomalias estruturais muitas vezes não reveladas pelas técnicas convencionais de análise. Ao final das 22 semanas, a ocorrência média de espermatozóides com membrana citoplasmática lesada foi de $41,24 \pm 1,94\%$ (CONT), de $40,82 \pm 2,04\%$ (bST), de $45,61 \pm 2,46\%$ (INSUL) e de $49,83 \pm 2,42\%$ (IbST), sendo significativos os efeitos de tempo ($P = 0,0001$) e de tempo X insulação ($P = 0,0001$) sobre os resultados.

Tabela 31 – Ocorrência de espermatozoides com membrana citoplasmática lesada em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	60,13 $\pm$ 6,94	43,38 $\pm$ 4,02	31,88 $\pm$ 9,02	41,38 $\pm$ 5,69	44,19 $\pm$ 3,98	0,0566	0,6130	0,0903
2	39,75 $\pm$ 5,68	37,63 $\pm$ 7,32	34,00 $\pm$ 4,55	34,13 $\pm$ 4,01	36,38 $\pm$ 2,56	0,3472	0,8350	0,8148
3	36,13 $\pm$ 9,29	50,75 $\pm$ 13,45	38,75 $\pm$ 7,38	30,50 $\pm$ 6,66	39,03 $\pm$ 4,68	0,3934	0,7532	0,2746
4	38,88 $\pm$ 10,49	29,38 $\pm$ 7,37	22,75 $\pm$ 6,52	33,25 $\pm$ 6,63	31,06 $\pm$ 3,85	0,4336	0,9481	0,2136
5	28,75 $\pm$ 3,62	30,88 $\pm$ 3,49	41,25 $\pm$ 4,89	28,25 $\pm$ 2,63	32,28 $\pm$ 2,16	0,1717	0,1364	0,0490
6	32,38 $\pm$ 2,58	44,25 $\pm$ 5,13	39,63 $\pm$ 7,51	38,38 $\pm$ 1,78	38,66 $\pm$ 2,41	0,8999	0,3437	0,2482
7	34,13 $\pm$ 6,51	28,38 $\pm$ 3,75	60,38 $\pm$ 7,78	77,75 $\pm$ 5,83	50,16 $\pm$ 5,85	0,0001	0,3402	0,0762
8	50,00 $\pm$ 11,87	40,38 $\pm$ 6,53	89,50 $\pm$ 7,01	81,63 $\pm$ 8,26	65,38 $\pm$ 6,60	0,0018	0,3682	0,9266
9	38,25 $\pm$ 4,88	41,50 $\pm$ 3,80	91,13 $\pm$ 6,42	84,75 $\pm$ 6,75	63,91 $\pm$ 6,72	< 0,0001	0,8060	0,4560
10	28,25 $\pm$ 5,40	38,75 $\pm$ 7,63	66,00 $\pm$ 9,76	66,25 $\pm$ 14,58	49,81 $\pm$ 6,20	0,0150	0,6330	0,6487
11	35,00 $\pm$ 4,36	32,38 $\pm$ 5,97	56,73 $\pm$ 12,55	48,38 $\pm$ 13,30	43,12 $\pm$ 5,10	0,0406	0,5046	0,7253
12	30,00 $\pm$ 9,92	36,00 $\pm$ 8,06	72,20 $\pm$ 11,94	52,53 $\pm$ 12,12	47,68 $\pm$ 6,37	0,0222	0,5368	0,2587
13	33,63 $\pm$ 5,83	35,00 $\pm$ 4,07	52,85 $\pm$ 8,81	68,15 $\pm$ 6,64	47,41 $\pm$ 4,69	0,0044	0,2599	0,3415
14	71,50 $\pm$ 9,93	42,50 $\pm$ 12,31	45,08 $\pm$ 4,08	62,05 $\pm$ 9,65	55,28 $\pm$ 5,25	0,6582	0,4442	0,0136
15	48,25 $\pm$ 14,09	46,13 $\pm$ 7,80	34,38 $\pm$ 4,36	59,78 $\pm$ 6,71	47,13 $\pm$ 4,65	0,9911	0,2662	0,1945
16	37,50 $\pm$ 7,13	42,50 $\pm$ 10,28	45,88 $\pm$ 7,23	43,58 $\pm$ 10,80	42,36 $\pm$ 4,11	0,5757	0,8719	0,6643
17	46,50 $\pm$ 8,50	41,38 $\pm$ 9,82	29,38 $\pm$ 2,63	41,48 $\pm$ 11,43	39,68 $\pm$ 4,24	0,2893	0,7582	0,3320
18	39,75 $\pm$ 10,26	56,63 $\pm$ 12,97	26,88 $\pm$ 1,42	49,38 $\pm$ 10,45	43,16 $\pm$ 5,25	0,3129	0,0660	0,7719
19	51,38 $\pm$ 10,82	50,75 $\pm$ 16,91	33,38 $\pm$ 7,14	48,88 $\pm$ 9,81	46,09 $\pm$ 5,58	0,3280	0,4587	0,4231
20	39,38 $\pm$ 9,45	49,50 $\pm$ 17,51	32,25 $\pm$ 6,60	47,63 $\pm$ 8,51	42,19 $\pm$ 5,36	0,7097	0,3045	0,8276
21	36,00 $\pm$ 11,65	37,50 $\pm$ 14,20	36,63 $\pm$ 6,72	27,00 $\pm$ 5,65	34,28 $\pm$ 4,68	0,6687	0,7244	0,6303
22	51,88 $\pm$ 7,25	42,63 $\pm$ 17,90	22,50 $\pm$ 4,50	31,13 $\pm$ 3,33	37,03 $\pm$ 5,34	0,0830	0,9769	0,4160
Média	41,24 $\pm$ 1,94	40,82 $\pm$ 2,04	45,61 $\pm$ 2,46	49,83 $\pm$ 2,42	44,37 $\pm$ 1,13	0,1503	0,6655	0,5984

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,5649

Tempo X Insulação X bST = 0,0819

Gráfico 22 – Ocorrência de espermatozoides com membrana citoplasmática lesada em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

O número de **espermatozóides com acrosso**mo lesado dentro de uma população espermática constitui importante informação, uma vez que a integridade do acrossomo é requisito fundamental para que a célula possa ser capacitada no momento adequado e apresentar potencial fecundante.

Durante a fase pré-insulação, as médias semanais dos dezesseis touros relativas à percentagem de espermatozóides com acrossomo lesado oscilaram entre $17,59 \pm 1,88\%$ e $24,81 \pm 2,76\%$. Considerando os diferentes grupos, na semana 5 os touros do grupo CONT apresentaram média de $17,88 \pm 3,80\%$, os do grupo bST apresentaram média de $17,88 \pm 2,24\%$, os do grupo INSUL apresentaram média de $28,63 \pm 8,25\%$ e os do grupo lbST apresentaram média de $18,38 \pm 2,97\%$. Não houve diferença estatística significativa entre as médias de espermatozóides com acrossomo lesado antes do início da insulação, como apresentado na tabela 32.

Houve efeito de tempo ($P=0,0001$) e de tempo X insulação ($P=0,0004$) durante o experimento, não sendo notados efeitos importantes de tempo X bST ($P=0,6197$) e de tempo X insulação X bST ($P=0,1928$).

Durante a fase pré-insulação as médias entre os grupos foram bem próximas, porém, durante a fase pré-tratamento, houve acréscimo nos níveis de lesão de acrossomo nos animais dos grupos INSUL e lbST, a partir da semana 7 (9 dias após a insulação) e da semana 6 (2 dias após a insulação) respectivamente. Os níveis máximos atingidos durante a fase pré-tratamento ocorreram na semana 8 para os grupos CONT e bST ($26,63 \pm 5,49\%$ no grupo CONT e $21,88 \pm 3,42\%$ no grupo bST) e na semana 7 para os grupos INSUL e lbST ($34,38 \pm 4,04\%$ no grupo INSUL e $49,13 \pm 10,09\%$ no grupo lbST). Na semana 7, foi significativo o efeito da insulação sobre os resultados apresentados ($P=0,0033$).

O retorno dos índices a níveis semelhantes aos expressos antes da insulação ocorreu na semana 9 (23 dias após o final da insulação), a qual foi a primeira semana da fase de tratamento, quando o bST passou a ser administrado aos animais dos grupos bST e lbST. Nas fases tratamento (semanas 10 a 17) e pós-tratamento (semanas 18 a 22) o perfil de ocorrência média de acrossomo lesado entre os grupos não diferiu muito, com exceção feita ao comportamento de pequenos picos apresentado pelo grupo INSUL (semana 12: $38,95 \pm 12,13\%$), pelo grupo CONT (semana 15: $30,50 \pm 13,18\%$) e pelo grupo bST (semana 16: $27,13 \pm 1,81\%$), contudo sem haver diferença estatística significativa.

O comportamento dos grupos CONT, bST, INSUL e lbST ao longo das fases de tratamento pode ser evidenciado no gráfico 23.

Tabela 32 – Ocorrência de espermatozóides com acrossomo lesado em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	29,00 $\pm$ 5,22	26,88 $\pm$ 3,66	18,75 $\pm$ 7,53	24,63 $\pm$ 6,00	24,81 $\pm$ 2,76	0,3357	0,7672	0,5314
2	24,63 $\pm$ 3,05	22,75 $\pm$ 4,62	20,38 $\pm$ 2,29	20,25 $\pm$ 5,48	22,00 $\pm$ 1,88	0,3982	0,7986	0,8233
3	12,38 $\pm$ 3,13	19,38 $\pm$ 5,69	21,50 $\pm$ 3,06	17,13 $\pm$ 1,88	17,59 $\pm$ 1,88	0,4176	0,7531	0,1934
4	23,13 $\pm$ 6,15	17,25 $\pm$ 3,54	17,50 $\pm$ 5,01	20,63 $\pm$ 4,34	19,63 $\pm$ 2,26	0,8053	0,7634	0,3364
5	17,88 $\pm$ 3,80	17,88 $\pm$ 2,24	28,63 $\pm$ 8,25	18,38 $\pm$ 2,97	20,69 $\pm$ 2,49	0,2637	0,3057	0,3057
6	16,75 $\pm$ 2,09	20,00 $\pm$ 2,15	21,00 $\pm$ 3,72	22,13 $\pm$ 1,85	19,97 $\pm$ 1,26	0,2474	0,4179	0,6897
7	20,63 $\pm$ 5,33	17,50 $\pm$ 3,78	34,38 $\pm$ 4,04	49,13 $\pm$ 10,09	30,41 $\pm$ 4,30	0,0033	0,3360	0,1526
8	26,63 $\pm$ 5,49	21,88 $\pm$ 3,42	33,63 $\pm$ 6,27	31,13 $\pm$ 10,24	28,31 $\pm$ 3,26	0,1878	0,5407	0,8480
9	20,75 $\pm$ 2,74	17,38 $\pm$ 2,48	17,13 $\pm$ 4,02	18,75 $\pm$ 8,25	18,50 $\pm$ 2,24	0,8260	0,8642	0,6272
10	11,00 $\pm$ 4,35	15,25 $\pm$ 4,87	22,50 $\pm$ 5,58	17,50 $\pm$ 4,10	16,56 $\pm$ 2,38	0,1022	0,9231	0,2521
11	15,38 $\pm$ 3,05	15,00 $\pm$ 2,27	21,10 $\pm$ 2,69	16,50 $\pm$ 3,88	16,99 $\pm$ 1,49	0,2579	0,4271	0,4978
12	16,00 $\pm$ 3,84	17,00 $\pm$ 3,91	38,95 $\pm$ 12,13	15,40 $\pm$ 2,86	21,84 $\pm$ 3,97	0,1334	0,1154	0,0903
13	15,88 $\pm$ 3,99	25,13 $\pm$ 4,60	25,45 $\pm$ 5,21	30,63 $\pm$ 4,83	24,27 $\pm$ 2,50	0,1211	0,1358	0,6545
14	24,50 $\pm$ 8,46	22,25 $\pm$ 9,12	23,15 $\pm$ 3,47	23,48 $\pm$ 2,14	23,34 $\pm$ 2,93	0,9919	0,8765	0,8355
15	30,50 $\pm$ 13,18	23,50 $\pm$ 2,97	18,38 $\pm$ 6,07	21,03 $\pm$ 0,91	23,35 $\pm$ 3,52	0,3897	0,7938	0,5651
16	17,63 $\pm$ 3,84	27,13 $\pm$ 1,81	26,63 $\pm$ 5,28	19,00 $\pm$ 3,43	22,59 $\pm$ 2,03	0,9203	0,8305	0,0750
17	14,75 $\pm$ 2,80	19,13 $\pm$ 2,41	11,38 $\pm$ 3,51	13,15 $\pm$ 4,99	14,60 $\pm$ 1,76	0,1967	0,3830	0,7072
18	16,63 $\pm$ 4,29	22,75 $\pm$ 6,44	9,25 $\pm$ 1,79	18,20 $\pm$ 4,49	16,71 $\pm$ 2,40	0,2305	0,1384	0,7675
19	29,00 $\pm$ 10,11	20,25 $\pm$ 4,83	15,88 $\pm$ 2,97	19,50 $\pm$ 4,73	21,16 $\pm$ 3,06	0,2656	0,6714	0,3173
20	16,88 $\pm$ 5,30	13,88 $\pm$ 2,69	17,88 $\pm$ 6,15	23,38 $\pm$ 6,44	18,00 $\pm$ 2,55	0,3628	0,8245	0,4576
21	13,88 $\pm$ 4,22	9,00 $\pm$ 3,91	18,00 $\pm$ 3,92	18,25 $\pm$ 2,84	14,78 $\pm$ 1,94	0,1323	0,5811	0,5417
22	20,38 $\pm$ 6,85	12,50 $\pm$ 2,35	11,63 $\pm$ 1,30	11,50 $\pm$ 1,40	14,00 $\pm$ 1,93	0,2533	0,3428	0,3574
Média	19,73 $\pm$ 1,21	19,26 $\pm$ 0,91	21,50 $\pm$ 1,26	21,35 $\pm$ 1,25	20,46 $\pm$ 0,58	0,4227	0,8937	0,9455

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0004

Tempo X bST = 0,6197

Tempo X Insulação X bST = 0,1928

Gráfico 23 – Ocorrência de espermatozoides com acrosso-mo lesado em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Tempo: 0,0001

Tempo X Insulação: 0,0004

Efeitos:

Tempo X bST: 0,6197

Tempo X Insulação X bST: 0,1928

Conhecer o número de **espermatozóides sem potencial mitocondrial** em uma população espermática é importante, pois a atividade mitocondrial resulta em energia, a qual é empregada para a movimentação do espermatozóide e para a manutenção da atividade metabólica espermática.

Como demonstrado na tabela 33, houve efeito significativo de tempo ($P=0,0001$) e de tempo X insulação ($P=0,0001$) nos resultados, o mesmo não ocorrendo com tempo X bST e com tempo X insulação X bST.

Na fase pré-insulação, os animais dos grupos CONT, bST, INSUL e IbST apresentavam nenhuma diferença significativa entre suas médias para células sem potencial mitocondrial. Na semana 5, os valores expressos foram de $5,25 \pm 1,53\%$ para o grupo CONT, de $7,25 \pm 2,50\%$ para o grupo bST, de $5,50 \pm 1,71\%$ para o grupo INSUL e de $4,63 \pm 0,55\%$ para o grupo IbST.

Após a insulação, os animais dos grupos INSUL e IbST apresentaram ligeiro aumento (da ordem de 2%) nos índices verificados na semana 6, como indicado no gráfico 24. Porém, incrementos de 21% e 33% foram detectados na semana 7 (9 dias após o final da insulação) para os respectivos grupos. Durante a fase pré-tratamento, os níveis máximos atingidos pelos grupos foram de $4,63 \pm 2,59\%$ no grupo CONT (semana 8), de $9,38 \pm 1,55\%$ no grupo bST (semana 6), de $52,63 \pm 2,44\%$ no grupo INSUL (semana 8) e de $45,50 \pm 10,19\%$ no grupo IbST (semana 9).

Durante parte das fases pré-tratamento e tratamento, no período compreendido pelas semanas 7 a 12, o efeito da insulação foi sempre significativo, de modo que comparativamente os animais insulados apresentaram médias de células sem potencial mitocondrial maiores que os animais não insulados.

O retorno ao níveis próximos dos observados antes da insulação ocorreu mais rapidamente para os animais do grupo INSUL que para os animais do grupo IbST, de

modo que os primeiros atingiram $7,28 \pm 2,73\%$ na semana 13 e os outros atingiram $7,50 \pm 2,35\%$ somente na semana 22. De fato, no gráfico 24 observa-se retorno mais lento para os animais insulados que receberam bST do que aqueles que foram somente insulados.

Nas semanas 12 e 15 foram observados valores de $P < 0,05$ para efeito da somatotropina, apontando para níveis mais elevados de células sem potencial mitocondrial nos grupos de animais que foram tratados com bST. Também relativo às fases de tratamento e pós-tratamento, é perceptível que os animais não insulados que receberam bST (grupo bST) apresentaram entre as semanas 13 e 18 um pequeno acréscimo progressivo nos níveis de espermatozóides sem potencial mitocondrial, evento este que não foi acompanhado pelo grupo controle.

Ao final do período experimental, as médias observadas para os grupos foram de $6,70 \pm 0,84\%$ para o CONT, de $10,25 \pm 1,15\%$ para o bST, de $13,22 \pm 1,58\%$ para o INSUL e de $19,38 \pm 2,13\%$ para o lbST.

Tabela 33 – Ocorrência de espermatozoides sem potencial mitocondrial em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	33,50 $\pm$ 8,64	20,00 $\pm$ 3,51	17,50 $\pm$ 7,32	22,00 $\pm$ 4,91	23,25 $\pm$ 3,28	0,3095	0,9036	0,2349
2	4,00 $\pm$ 0,89	7,50 $\pm$ 2,94	3,63 $\pm$ 1,55	6,75 $\pm$ 1,56	5,47 $\pm$ 0,95	0,6624	0,0833	0,5995
3	5,38 $\pm$ 2,08	7,50 $\pm$ 2,65	4,63 $\pm$ 1,03	6,63 $\pm$ 1,99	6,03 $\pm$ 0,95	0,7525	0,1435	0,8675
4	8,25 $\pm$ 4,94	6,25 $\pm$ 2,59	1,88 $\pm$ 0,38	5,88 $\pm$ 1,57	5,56 $\pm$ 1,43	0,3296	0,3459	0,1043
5	5,25 $\pm$ 1,53	7,25 $\pm$ 2,50	5,50 $\pm$ 1,71	4,63 $\pm$ 0,55	5,66 $\pm$ 0,81	0,5607	0,6303	0,6196
6	3,25 $\pm$ 0,14	9,38 $\pm$ 1,55	7,00 $\pm$ 2,03	7,00 $\pm$ 0,65	6,66 $\pm$ 0,82	0,2942	0,0043	0,0148
7	4,63 $\pm$ 1,55	7,38 $\pm$ 1,14	28,00 $\pm$ 2,72	40,25 $\pm$ 16,76	20,06 $\pm$ 5,39	0,0162	0,7915	0,4905
8	4,63 $\pm$ 2,59	9,00 $\pm$ 3,87	52,63 $\pm$ 2,44	42,45 $\pm$ 3,17	27,18 $\pm$ 5,53	< 0,0001	0,3782	0,1163
9	2,63 $\pm$ 0,38	5,00 $\pm$ 2,13	49,38 $\pm$ 9,26	45,50 $\pm$ 10,19	25,63 $\pm$ 6,45	< 0,0001	0,6035	0,3676
10	2,75 $\pm$ 0,85	6,25 $\pm$ 1,48	16,88 $\pm$ 2,30	41,58 $\pm$ 15,47	16,86 $\pm$ 5,27	0,0008	0,0765	0,7927
11	6,38 $\pm$ 0,52	4,75 $\pm$ 2,17	14,18 $\pm$ 2,88	24,50 $\pm$ 15,85	12,45 $\pm$ 4,16	0,0140	0,5147	0,3446
12	6,00 $\pm$ 3,40	8,63 $\pm$ 2,88	12,83 $\pm$ 2,73	25,35 $\pm$ 13,69	13,20 $\pm$ 3,80	0,0018	0,0497	0,7753
13	3,25 $\pm$ 1,45	5,88 $\pm$ 1,51	7,28 $\pm$ 2,73	23,58 $\pm$ 12,46	9,99 $\pm$ 3,55	0,0555	0,0849	0,6993
14	5,75 $\pm$ 1,93	12,88 $\pm$ 7,88	6,93 $\pm$ 1,94	20,40 $\pm$ 11,63	11,49 $\pm$ 3,54	0,3606	0,1168	0,7274
15	5,13 $\pm$ 1,97	11,13 $\pm$ 5,38	6,13 $\pm$ 0,83	21,83 $\pm$ 9,42	11,05 $\pm$ 3,01	0,0941	0,0196	0,5625
16	7,63 $\pm$ 2,82	12,63 $\pm$ 6,67	8,50 $\pm$ 1,24	16,35 $\pm$ 9,54	11,28 $\pm$ 2,84	0,6351	0,4291	0,6885
17	6,88 $\pm$ 2,84	15,75 $\pm$ 10,46	7,13 $\pm$ 3,00	16,20 $\pm$ 7,47	11,49 $\pm$ 3,23	0,6751	0,0880	0,6861
18	8,50 $\pm$ 3,09	17,63 $\pm$ 11,15	8,75 $\pm$ 1,94	14,40 $\pm$ 6,08	12,32 $\pm$ 3,12	0,7298	0,1923	0,9102
19	8,00 $\pm$ 2,57	14,75 $\pm$ 9,81	15,75 $\pm$ 8,46	10,88 $\pm$ 5,39	12,34 $\pm$ 3,29	0,3741	0,8537	0,3352
20	6,25 $\pm$ 2,31	13,00 $\pm$ 7,91	4,13 $\pm$ 1,60	11,75 $\pm$ 2,43	8,78 $\pm$ 2,18	0,9109	0,0697	0,3118
21	4,13 $\pm$ 1,95	12,63 $\pm$ 8,56	7,63 $\pm$ 1,82	11,00 $\pm$ 5,11	8,84 $\pm$ 2,46	0,1448	0,2338	0,4875
22	5,25 $\pm$ 1,03	10,38 $\pm$ 5,87	4,63 $\pm$ 1,42	7,50 $\pm$ 2,35	6,94 $\pm$ 1,58	0,7910	0,2336	0,6961
Média	6,70 $\pm$ 0,84	10,25 $\pm$ 1,15	13,22 $\pm$ 1,58	19,38 $\pm$ 2,13	12,38 $\pm$ 0,79	0,0127	0,0602	0,9662

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,2324

Tempo X Insulação X bST = 0,3303

Gráfico 24 – Ocorrência de espermatozoides sem potencial mitocondrial em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Tempo: 0,0001

Tempo X Insulação: 0,0001

Efeitos:

Tempo X bST: 0,2324

Tempo X Insulação X bST: 0,3303

A população de **espermatozóides com membrana citoplasmática íntegra, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (MIAI-CP)** é considerada a população de interesse em qualquer ejaculado. Isso porque, em teoria, as células com essas características conjugadas possuem os atributos necessários para que possam participar do processo normal da fertilização. Por isso, apesar das células espermáticas terem sido classificadas em oito diferentes categorias no presente experimento, serão apresentados os resultados dados relativos somente à categoria MIAI-CP.

Houve efeito de tempo ($P=0,0001$) e de tempo X insulação ($P=0,0001$) sobre os resultados apresentados ao longo do experimento para espermatozóides MIAI-CP, conforme demonstrado na tabela 34.

Durante as cinco primeiras semanas do período experimental, a média semanal para espermatozóides MIAI-CP dos dezesseis touros esteve entre $52,63 \pm 4,11\%$ e $66,03 \pm 4,07\%$. Estes valores são correspondentes a níveis fisiológicos apresentados antes de qualquer intervenção sobre os animais, quer seja por meio de insulação, quer seja por tratamento com somatotropina, ou ambos.

A última mensuração da fase pré-insulação foi efetuada na semana 5 e apresentou os seguintes valores médios para os grupos: $69,38 \pm 3,40\%$ para o grupo CONT, $65,63 \pm 3,35\%$ para o grupo bST, $55,63 \pm 5,98\%$ para o grupo INSUL e $70,00 \pm 2,50\%$ para o grupo lbST, como demonstra o gráfico 25.

Dois dias após o final da insulação (semana 6) foi possível registrar decréscimo na população de espermatozóides MIAI-CP dos touros insulados (INSUL e lbST). Nas semanas 7, 8 e 9 o efeito da insulação nos resultados foi altamente significativo ($P<0,0001$; $P=0,0003$ e $P<0,0001$), permanecendo significativo nas

semanas 10 a 13 ($P < 0,05$), sempre com médias mais baixas para os grupos INSUL e lbST que para os grupos CONT e bST.

O menor índice de espermatozóides MIAI-CP apresentado por cada um dos grupos foi de $28,00 \pm 9,53\%$ para o grupo CONT na semana 14, de $41,13 \pm 13,89\%$ para o grupo bST na semana 18, de $4,38 \pm 9,53\%$ para o grupo INSUL na semana 8 e de $10,00 \pm 4,85\%$ para o grupo lbST na semana 17. Por outro lado, os maiores índices de espermatozóides MIAI-CP apresentados ao longo das 22 semanas foram de $71,00 \pm 5,53\%$ para o grupo CONT na semana 10, de $66,50 \pm 3,94\%$ para o grupo bST na semana 7, de $74,38 \pm 6,15\%$ para o grupo INSUL na semana 4 e de $70,00 \pm 2,50\%$ para o grupo lbST na semana 5.

As semanas 9 e 10 (23 e 30 dias após o final do término da insulação) foram marcadas por acréscimos nos valores médios não somente dos grupos INSUL e lbST, mas também dos grupos CONT e bST. Apesar das oscilações demonstradas por todos os grupos durante a fase de tratamento, ao seu final (semanas 16 e 17, logo, 72 e 79 dias após o final da insulação), não mais havia diferença estatística significativa entre as médias de espermatozóides MIAI-CP. Essa ausência de efeito significativo de tratamentos e de suas interações também foi constatada durante a fase pós-tratamento (semanas 18 a 22).

Ao final das 22 semanas de experimentação, as médias observadas para os grupos foram de $56,78 \pm 1,92\%$ para o CONT, de $56,37 \pm 2,06\%$ para o bST, de $51,32 \pm 2,50\%$ para o INSUL e de $45,87 \pm 2,62\%$ para o lbST. A média semanal geral após 22 semanas foi de $52,58 \pm 1,17\%$ de espermatozóides MIAI-CP por amostra de sêmen avaliada.

Tabela 34 – Ocorrência de espermatozóides com membrana citoplasmática íntegra, com acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (MIAI-CP) em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	36,25 $\pm$ 6,55	55,13 $\pm$ 4,40	63,75 $\pm$ 10,16	55,38 $\pm$ 6,06	52,63 $\pm$ 4,11	0,0920	0,4936	0,0971
2	58,63 $\pm$ 5,47	60,88 $\pm$ 7,91	65,25 $\pm$ 4,77	64,75 $\pm$ 4,14	62,38 $\pm$ 2,67	0,2963	0,8575	0,7781
3	62,88 $\pm$ 8,96	47,00 $\pm$ 13,11	58,25 $\pm$ 7,66	67,63 $\pm$ 7,21	58,94 $\pm$ 4,70	0,4360	0,7481	0,2304
4	58,13 $\pm$ 11,50	67,13 $\pm$ 7,51	74,38 $\pm$ 6,15	64,50 $\pm$ 7,71	66,03 $\pm$ 4,07	0,3655	0,9525	0,2193
5	69,38 $\pm$ 3,40	65,63 $\pm$ 3,35	55,63 $\pm$ 5,98	70,00 $\pm$ 2,50	65,16 $\pm$ 2,33	0,2400	0,1877	0,0378
6	66,50 $\pm$ 2,48	52,75 $\pm$ 4,96	57,75 $\pm$ 7,06	58,50 $\pm$ 2,23	58,88 $\pm$ 2,43	0,7707	0,2254	0,1805
7	64,88 $\pm$ 6,61	66,50 $\pm$ 3,94	29,88 $\pm$ 6,65	10,00 $\pm$ 4,85	42,81 $\pm$ 6,67	< 0,0001	0,1507	0,0973
8	49,50 $\pm$ 12,01	56,13 $\pm$ 7,27	4,38 $\pm$ 2,40	10,25 $\pm$ 5,37	30,06 $\pm$ 6,84	0,0003	0,4546	0,9636
9	61,25 $\pm$ 5,11	57,13 $\pm$ 4,08	6,50 $\pm$ 5,52	10,38 $\pm$ 5,79	33,81 $\pm$ 6,97	< 0,0001	0,9833	0,5087
10	71,00 $\pm$ 5,53	58,88 $\pm$ 7,07	30,50 $\pm$ 9,30	26,88 $\pm$ 15,74	46,81 $\pm$ 6,63	0,0101	0,4990	0,7127
11	63,38 $\pm$ 5,12	66,38 $\pm$ 6,33	40,45 $\pm$ 12,33	46,25 $\pm$ 15,53	54,11 $\pm$ 5,57	0,0389	0,6333	0,8786
12	64,75 $\pm$ 8,85	62,38 $\pm$ 8,33	25,75 $\pm$ 11,77	42,48 $\pm$ 13,88	48,84 $\pm$ 6,39	0,0162	0,4904	0,3636
13	64,75 $\pm$ 5,25	63,13 $\pm$ 3,43	45,50 $\pm$ 8,57	27,98 $\pm$ 8,23	50,34 $\pm$ 4,89	0,0034	0,1978	0,2781
14	28,00 $\pm$ 9,53	55,63 $\pm$ 13,29	53,58 $\pm$ 4,06	34,83 $\pm$ 11,06	43,01 $\pm$ 5,45	0,7690	0,5875	0,0165
15	50,00 $\pm$ 14,06	50,63 $\pm$ 8,65	63,75 $\pm$ 4,26	36,58 $\pm$ 8,02	50,24 $\pm$ 4,89	0,9884	0,2202	0,2010
16	59,63 $\pm$ 7,18	49,88 $\pm$ 8,04	52,75 $\pm$ 7,19	53,18 $\pm$ 12,06	53,86 $\pm$ 4,06	0,8185	0,5528	0,5180
17	52,13 $\pm$ 8,61	53,50 $\pm$ 11,23	68,88 $\pm$ 2,39	55,53 $\pm$ 12,42	57,51 $\pm$ 4,58	0,3892	0,3666	0,4378
18	57,75 $\pm$ 9,56	41,13 $\pm$ 13,89	71,13 $\pm$ 1,52	47,90 $\pm$ 10,63	54,48 $\pm$ 5,34	0,3090	0,0618	0,7321
19	45,75 $\pm$ 11,04	46,88 $\pm$ 16,61	61,88 $\pm$ 8,33	48,50 $\pm$ 10,03	50,75 $\pm$ 5,58	0,3727	0,5336	0,4631
20	58,25 $\pm$ 9,14	47,88 $\pm$ 17,43	64,88 $\pm$ 6,77	48,63 $\pm$ 8,56	54,91 $\pm$ 5,35	0,7610	0,2869	0,8084
21	60,00 $\pm$ 10,72	60,38 $\pm$ 14,79	60,38 $\pm$ 6,18	61,88 $\pm$ 6,16	60,66 $\pm$ 4,53	0,9308	0,9308	0,9584
22	46,50 $\pm$ 7,14	55,25 $\pm$ 17,45	73,88 $\pm$ 3,24	67,13 $\pm$ 3,93	60,69 $\pm$ 5,15	0,0894	0,9249	0,4714
Média	56,78 $\pm$ 1,92	56,37 $\pm$ 2,06	51,32 $\pm$ 2,50	45,87 $\pm$ 2,62	52,58 $\pm$ 1,17	0,1093	0,5301	0,5887

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,4522

Tempo X Insulação X bST = 0,0819

Gráfico 25 – Ocorrência de espermatozóides com membrana citoplasmática íntegra, com acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (MIAI-CP) em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

5.8 INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA

A fragmentação do DNA determina a **integridade de estrutura da cromatina** carregada por um gameta. Avaliar a estrutura da cromatina no espermatozóide é importante pois este, além de possuir atributos para a fecundação, deve ser capaz de participar da singamia, de modo que a integridade morfofuncional dos cromossomos paternos possibilite o pareamento normal e o início das primeiras clivagens.

Conforme descrito em “Materiais e Métodos” (seção 4), para avaliação da integridade de estrutura da cromatina, os espermatozóides foram corados com sonda fluorescente (acridina laranja), avaliados em microscopia de epifluorescência. As células foram classificadas individualmente como portadoras de DNA fragmentado ou portadoras de DNA não-fragmentado, conforme a figura 12.

Figura 12 - Fotografias de microscopia de epifluorescência mostrando espermatozóides de diferentes categorias quanto à fragmentação do DNA: espermatozóide com cromatina íntegra (A) e espermatozóide com cromatina fragmentada (B).

Como indicado na tabela 35, houve influência do tempo ($P=0,0001$) e de tempo X insulação ($P=0,0001$) nos resultados de fragmentação do DNA. Não foi observado efeito significativo para o bST ($P=0,8807$) nem para tempo X insulação X bST ($P=0,9352$).

Durante a fase pré-insulação, as médias semanais dos dezesseis touros variaram entre $0,15 \pm 0,05\%$ e $0,86 \pm 0,71\%$. Na semana 5, imediatamente antes de iniciado o processo de insulação testicular, as médias apresentadas pelos grupos foram de $0,35 \pm 0,29\%$ para animais do grupo CONT, de $0,90 \pm 0,71\%$ para o grupo bST, de $0,10 \pm 0,10\%$ para o grupo INSUL e de $0,40 \pm 0,12\%$ para o grupo IbST. Não houve efeito de tratamento ou de suas interações em qualquer das semanas compreendidas pela fase pré-insulação (semanas 1 a 5).

Na fase pré-tratamento, logo após a instalação da insulação, os grupos INSUL e IbST apresentaram acréscimos em suas médias a partir da semana 6. Entre as semanas 8 e 9 (16 a 23 dias após o final da insulação) a elevação das médias dos grupos INSUL e IbST foi de maior monta, enquanto os grupos CONT e bST mantiveram suas médias sempre inferiores a 0,50% nessa fase. O aumento das médias de INSUL e IbST culminou em pico de ocorrência de fragmentação de DNA da ordem de $9,95 \pm 4,04\%$ para INSUL e $10,63 \pm 2,78\%$ para IbST, ambos detectados na semana 9. Ainda na semana 9 foram detectadas médias de $0,55 \pm 0,25\%$ para CONT e $0,45 \pm 0,21\%$ para bST, demonstrando que existiu efeito altamente significativo da insulação naquele momento ($P=0,0005$), com as maiores médias sendo expressas pelos animais dos grupos INSUL e IbST.

A fase tratamento (semanas 10 a 17) foi marcada pelo decréscimo na expressão de espermatozóides com fragmentação de DNA dos grupos INSUL e IbST e por pequenos picos isolados demonstrados pelos grupos CONT e bST. A

diminuição nos valores dos grupos INSUL e lbST se iniciou na semana 10 (30 dias após o final da insulação), porém foi mais lenta para o grupo lbST, pois o grupo INSUL demonstrava já na semana 10 valor médio de $1,50 \pm 0,40\%$, enquanto o grupo lbST somente retornou ao valor de $1,45 \pm 1,07\%$ na semana 18 (86 dias após o término da insulação). O grupo CONT apresentou na semana 14 um pequeno e eventual pico da ordem de $2,65 \pm 1,97\%$ enquanto o grupo bST apresentou fenômeno similar, porém na semana 15, da ordem de $3,65 \pm 1,38\%$. Esses eventos podem ser observados no gráfico 26.

Durante a fase pós-tratamento (semanas 18 a 22) não houve diferença estatística entre as médias apresentadas pelos grupos CONT, bST, INSUL e lbST. As médias após 22 semanas de experimentação foram: $0,56 \pm 0,11\%$ para o grupo CONT, de $0,82 \pm 0,14\%$ para o grupo bST, de $1,48 \pm 0,32\%$ para o grupo INSUL e de $3,44 \pm 0,70\%$ para o grupo lbST.

Tabela 35 – Ocorrência de espermatozóides com fragmentação de DNA em porcentagem ($\pm$ EPM) detectados na microscopia de epifluorescência em ejaculados de touros segundo diferentes tratamentos e probabilidades de efeitos de insulação, somatotropina e interação durante 22 semanas de período experimental. Pirassununga, 2004

SEMANA*	TRATAMENTOS**				Média Semanal (n=16)	PROBABILIDADES		
	CONT (n=4)	bST (n=4)	INSUL (n=4)	lbST (n=4)		Insulação	bST	Interação
1	0,05 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,19	0,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,05	0,8750	0,4448	0,4020
2	0,40 $\pm$ 0,20	0,75 $\pm$ 0,21	0,50 $\pm$ 0,13	1,50 $\pm$ 1,03	0,79 $\pm$ 0,27	0,5214	0,1988	0,8143
3	0,45 $\pm$ 0,32	0,50 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,59	0,63 $\pm$ 0,19	0,4191	0,1870	0,2899
4	0,10 $\pm$ 0,10	0,25 $\pm$ 0,25	2,90 $\pm$ 2,83	0,20 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,71	0,3756	0,5230	0,3678
5	0,35 $\pm$ 0,29	0,90 $\pm$ 0,71	0,10 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,19	0,4971	0,2974	0,9617
6	0,35 $\pm$ 0,22	0,45 $\pm$ 0,26	0,60 $\pm$ 0,22	0,35 $\pm$ 0,10	0,44 $\pm$ 0,10	0,6475	0,7790	0,5053
7	0,25 $\pm$ 0,19	0,05 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,24	1,90 $\pm$ 1,31	0,68 $\pm$ 0,35	0,0550	0,4973	0,1968
8	0,30 $\pm$ 0,30	0,55 $\pm$ 0,15	2,25 $\pm$ 1,73	3,35 $\pm$ 1,95	1,61 $\pm$ 0,67	0,0691	0,4293	0,8982
9	0,55 $\pm$ 0,25	0,45 $\pm$ 0,21	9,95 $\pm$ 4,04	10,63 $\pm$ 2,78	5,39 $\pm$ 1,68	0,0005	0,6788	0,5644
10	0,25 $\pm$ 0,15	0,45 $\pm$ 0,17	1,50 $\pm$ 0,40	6,83 $\pm$ 5,84	2,26 $\pm$ 1,48	0,0610	0,4925	0,7555
11	0,20 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,10	2,50 $\pm$ 0,61	9,15 $\pm$ 7,63	3,09 $\pm$ 1,95	0,0121	0,4546	0,9122
12	0,50 $\pm$ 0,17	1,05 $\pm$ 0,22	3,38 $\pm$ 1,34	8,38 $\pm$ 6,58	3,33 $\pm$ 1,70	0,0214	0,3397	0,9728
13	0,60 $\pm$ 0,22	1,30 $\pm$ 1,10	1,85 $\pm$ 0,82	6,58 $\pm$ 5,84	2,58 $\pm$ 1,47	0,2546	0,6349	0,8196
14	2,65 $\pm$ 1,97	1,00 $\pm$ 0,67	2,25 $\pm$ 0,73	6,75 $\pm$ 4,54	3,16 $\pm$ 1,26	0,1518	0,8349	0,3214
15	1,05 $\pm$ 0,46	3,65 $\pm$ 1,38	1,30 $\pm$ 0,31	5,35 $\pm$ 3,63	2,84 $\pm$ 0,99	0,6921	0,0340	0,8488
16	0,45 $\pm$ 0,21	0,85 $\pm$ 0,36	0,45 $\pm$ 0,21	3,33 $\pm$ 3,06	1,27 $\pm$ 0,76	0,6923	0,3018	0,6968
17	0,30 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,29	0,20 $\pm$ 0,08	2,85 $\pm$ 2,04	0,99 $\pm$ 0,54	0,4209	0,1111	0,2758
18	0,40 $\pm$ 0,27	0,35 $\pm$ 0,21	0,10 $\pm$ 0,06	1,45 $\pm$ 1,07	0,58 $\pm$ 0,29	0,5783	0,1355	0,1078
19	1,05 $\pm$ 0,34	0,65 $\pm$ 0,15	0,70 $\pm$ 0,39	0,95 $\pm$ 0,56	0,84 $\pm$ 0,18	0,7263	0,8381	0,4635
20	0,95 $\pm$ 0,46	2,25 $\pm$ 1,63	0,80 $\pm$ 0,27	1,60 $\pm$ 0,54	1,40 $\pm$ 0,43	0,9778	0,2872	0,9145
21	0,90 $\pm$ 0,37	0,80 $\pm$ 0,42	0,20 $\pm$ 0,14	2,50 $\pm$ 1,66	1,10 $\pm$ 0,45	0,9307	0,3302	0,2460
22	0,15 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,40	0,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,10	0,6855	0,6425	0,6425
Média	0,56 $\pm$ 0,11	0,82 $\pm$ 0,14	1,48 $\pm$ 0,32	3,44 $\pm$ 0,70	1,57 $\pm$ 0,20	0,0298	0,1559	0,4893

* Semanas 1 a 5: Pré-Insulação, Semanas 6 a 9: Pré-Tratamento, Semanas 10 a 17: Tratamento, Semanas 18 a 22: Pós-Tratamento

** CONT: grupo controle, bST: grupo que recebeu somatotropina, INSUL: grupo insulado, lbST: grupo insulado + somatotropina.

Efeitos:

Tempo = 0,0001

Tempo X Insulação = 0,0001

Tempo X bST = 0,8807

Tempo X Insulação X bST = 0,9352

Gráfico 26 – Ocorrência de espermatozoides com fragmentação de DNA em ejaculados de touros dos grupos controle (CONT), somatotropina (bST), insulação (INSUL) e insulação/bST (IbST) durante 22 semanas de período experimental - Pirassununga-SP, 2004

Tempo: 0,0001 Tempo X Insulação: 0,0001 Efeitos: Tempo X bST: 0,8807 Tempo X Insulação X bST: 0,9352

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DADOS CLIMÁTICOS

A temperatura média de 22,7°C registrada no local do experimento durante o período experimental está dentro da faixa de temperatura ambiental considerada adequada para a manutenção normal da espermatogênese em bovinos, visto que a temperatura ambiente crítica para prejuízo da espermatogênese está na faixa de 27 e 32°C segundo Skinner e Louw (1966), 26,4 a 32,2°C segundo Casady; Myers e Legates (1952) ou mais elevadas que 30°C, segundo Silva e Casagrande (1976).

A umidade relativa média aferida de 77,1% esteve ligeiramente acima daquela registrada por Brito et al. (2002), os quais concluíram que a umidade média entre 68,7 e 71,4% conjugada a temperaturas ambientais de 22,6 a 23,4°C não é suficiente para prejudicar a qualidade seminal de touros mantidos em centrais de inseminação artificial.

Deste modo, apesar do experimento ter ocorrido em época de temperaturas mais quentes e maior umidade, o comportamento climático local registrado entre os meses de novembro de 2003 a abril de 2004 foi favorável à execução do mesmo porque, em teoria, não houve interferência da irradiação ambiental nem da quantidade de chuvas sobre os resultados.

6.2 TEMPERATURA RETAL E TEMPERATURA DA SUPERFÍCIE ESCROTAL

A temperatura retal média dos animais apresentou pequenas oscilações ao longo das semanas. Quando as variações ocorreram, as maiores ou menores temperaturas aferidas para todos os grupos estiveram dentro dos limites fisiológicos para a espécie. As médias registradas para os grupos (CONT = $38,53 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$; bST = $38,69 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$; INSUL = $38,89 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ e lbST = $38,65 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$) foram próximas às médias registradas por Gabaldi (1999) para animais controle e animais insulados ($38,5^{\circ}\text{C}$ e $38,4^{\circ}\text{C}$, respectivamente).

A temperatura média da superfície escrotal de cada grupo praticamente não diferiu ao final do experimento, ficando na casa de $34,5$ a $34,6^{\circ}\text{C}$. Porém, a diferença entre as maiores e menores médias alcançadas dentro de cada grupo foi de $2,55^{\circ}\text{C}$ para o grupo CONT, de $2,67^{\circ}\text{C}$ para o grupo bST, de $2,85^{\circ}\text{C}$ para o grupo INSUL e de $3,13^{\circ}\text{C}$ para o grupo lbST.

Durante a insulação, a temperatura média da superfície escrotal dos animais insulados alcançou valores próximos aos encontrados por Gabaldi (1999), os quais foram de $36,4^{\circ}\text{C}$ e aos encontrados por Vogler; Saacke e Bame (1993), que detectaram $34,8^{\circ}\text{C}$. Porém, os dados do presente experimento ficaram aquém daqueles registrados por Bonilla et al. (2004), que obtiveram temperaturas da superfície escrotal variando entre $34,6$ e $39,9^{\circ}\text{C}$ em procedimento de insulação testicular que durou 120 horas.

Importante ressaltar que no presente trabalho, de acordo com os registros climáticos do período de insulação, as temperaturas da superfície escrotal estiveram acima da temperatura ambiental média diária cerca de $11,49^{\circ}\text{C}$, $11,51^{\circ}\text{C}$, $13,93^{\circ}\text{C}$ e

12,94°C durante o período de 24, 48, 72 e 96 horas de insulação. Desta forma, a partir dos dados de temperatura obtidos pode-se deduzir que a bolsa insuladora foi instrumento eficiente em impedir a dissipação do calor, dificultando o resfriamento testicular dos animais insulados, especialmente quando se considera a diferença de temperatura média ambiente e a temperatura no interior da bolsa insuladora durante sua utilização.

6.3 CONSISTÊNCIA TESTICULAR E PERÍMETRO ESCROTAL

Diferentemente do encontrado por Gabaldi (1999), a consistência testicular média pouco diferiu entre os grupos, apesar de individualmente alguns animais dos grupos INSUL e IbST terem apresentados maior flacidez após a insulação. Foi o caso do animal A151, pertencente ao grupo IbST, que clinicamente apresentou redução de 2,5 para 1,5 ponto, permanecendo com este índice durante um intervalo de oito semanas (dados individuais não apresentados). Talvez a utilização de uma escala de pontos mais larga (de 0 a 10, por exemplo) e o uso de métodos menos subjetivos poderiam contribuir para que os efeitos da insulação sobre a firmeza do tecido testicular à palpação fossem mais sensivelmente detectados nos resultados.

Foram detectados efeitos importantes do tempo e da interação tempo X insulação sobre o perímetro escrotal. O perímetro escrotal médio dos touros Simental ao início do experimento ($39,69 \pm 0,36\text{cm}$) era condizente com os dados encontrados por Pinho e colaboradores (2004), os quais detectaram valores médios

de $39,3 \pm 4,0$ cm de circunferência para animais da raça Simental equivalentes em idade e também criados a campo.

Entre as semanas 6 e 11, os animais dos grupos CONT e bST tiveram um aumento médio de 0,43cm e 0,25 centímetros em seus perímetros escrotais, denotando um ganho normal inerente ao processo de crescimento e desenvolvimento de touros jovens. No mesmo período, que abrange de 2 a 37 dias após o final da insulação, os animais dos grupos INSUL e IbST tiveram respectivamente redução média de 2,18 e 3,70 centímetros em seus perímetros escrotais. Esses dados se contrapõem aos apresentados por Gabaldi (1999), que não detectou diferença na biometria testicular entre animais controle e insulados (31,9 cm X 32,1 cm) e por Bonilla et al. (2004), que também não encontrou redução expressiva no perímetro escrotal de touros insulados.

A moderada flacidez e discreta diminuição do tamanho dos testículos demonstrada pelos animais dos grupos insulados são sinais apresentados por Van Camp (1997) como indicativos de degeneração testicular. De fato, os dados clínicos de aumento de flacidez testicular, a diminuição significativa do perímetro escrotal e as informações sobre características espermáticas dos animais insulados discutidas *a posteriori*, são suficientes para se chegar ao diagnóstico de degeneração testicular.

6.4 VOLUME, CONCENTRAÇÃO E PH SEMINAL

Como já colocado, as informações sobre volume são pouco relevantes, uma vez que o método de coleta utilizado (eletroejaculação) é bem aceito pela maioria dos animais e permite a predefinição da quantidade de sêmen a ser coletada, não oferecendo, portanto, informação biologicamente relevante como resultado.

A concentração espermática, por sua vez, é um dado importante dentro do contexto dessa análise. Apesar da eletroejaculação interferir nos resultados de concentração, com tendência a oferecer ejaculados normalmente menos concentrados, o perfil dos resultados ao longo das semanas e não seus valores absolutos podem ser úteis para a percepção de uma falha na produção espermática dos animais insulados.

Como a concentração é dada em função do volume seminal e este foi arbitrariamente variável ao longo das semanas, nota-se que existe uma grande oscilação entre os resultados semanais. É importante notar que a queda nas quantidades de espermatozóides por mL coletados nos animais dos grupos CONT e INSUL começou a decair na semanas 6 (2 dias após a insulação). Todos os grupos apresentaram oscilação negativa a partir da semana 7, com três dos quatro grupos apresentando as menores médias de concentração durante a semana 10, o que pode indicar fadiga de produção espermática dos animais frente ao método forçado de coleta.

Porém, o dado mais relevante da semana em questão é a média de concentração apresentada pelos grupos INSUL e IbST ($11,25 \pm 3,61$ e $3,25 \pm 1,09$ milhões de espermatozóides/mL, respectivamente). Esses resultados são fruto de

um quadro de azoospermia que se estabeleceu em alguns animais após a instalação do processo de insulação testicular, demonstrando a individualidade de resposta dos animais ao insulto térmico. Essa diminuição na produção espermática também foi observada por Casady; Myers e Legates (1952) e endossada por Silva e Casagrande (1976), embora estes últimos afirmem que o efeito seja mais visível em touros taurinos.

A diminuição da concentração apresentada por animais dos grupos insulados pode revelar indiretamente a exaustão de seu epitélio germinativo, que pode ser recuperável na dependência da intensidade da causa e à medida que o fator causador da injúria seja suprimido. Isso porque as populações de espermatogônias são sensíveis a injúrias causadas aos túbulos seminíferos. Apesar das espermatogônias Tipo A serem consideradas mais resistentes (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001), elas também são sujeitas a lesões, como as espermatogônias do Tipo B. Essa susceptibilidade a lesões pode determinar severas reduções no número total de espermatozóides produzidos, uma vez que as espermatogônias fazem parte do grupo de células germinativas proliferativas, ou seja, com capacidade de divisão celular e multiplicação numérica.

Outra questão a ser considerada é a possibilidade de degeneração celular pelo calor de qualquer célula da linhagem espermatogênica, como espermatócitos, espermátides e os próprios espermatozóides. É claro que o impacto numérico da morte celular sobre células não-divisíveis, como as supracitadas, é menor que o da morte celular de células-mãe, como as espermatogônias.

Há ainda que se considerar que, mesmo não originando diretamente os espermatozóides, as células de Sertoli são responsáveis por parte de seu desenvolvimento ao fornecer aos futuros gametas suporte físico e metabólico.

Lesões nos túbulos podem afetar também as células de Sertoli e diminuir severamente a capacidade de produção de espermatozóides não mais por perda de tecido germinativo, mas sim devido à menor capacidade de suporte para a produção diária de espermatozóides (SHARPE et al., 2003).

A redução no número de células potencialmente ejaculáveis pode também se dar no ambiente extragonadal, uma vez que as reservas epididimárias podem ser reduzidas devido à absorção seletiva de espermatozóides anormais na *rete testis* e no ducto deferente, fato constatado por Wildeus e Entwistle (1983).

O sêmen é um fluido rico em diferentes íons e ácido cítrico, com composição equilibrada e pH fisiológico entre 6,4 a 7,8. Apesar de terem sofrido efeito do tempo e da interação entre tempo e insulação, as variações ocorridas no pH dentro de cada grupo experimental ao longo das semanas representaram fator pouco preocupante à qualidade geral do sêmen. Isso porque todas as variações apresentadas se enquadram na faixa fisiológica para machos bovinos (GARNER; HAFEZ, 2004), o que não condiz com as alterações encontradas por Silva e Casagrande (1976), que encontraram diminuição do pH seminal conforme os touros estiveram submetidos a ambiente de mais elevadas temperaturas.

6.5 MOTILIDADE, VIGOR ESPERMÁTICO E MOVIMENTO DE MASSA

Vários são os trabalhos que demonstram a diminuição da motilidade espermática decorrente de indução de degeneração testicular por diminuição da capacidade de termorregulação local (CASADY; MYERS; LEGATES, 1952; GABALDI, 1999; KUMI-DIAKA; NAGARATNAM; RWUAAN, 1981, MEYERHOEFFER et al., 1985; RAO, 1967; VOGLER; SAACKE; BAME, 1993). Nos protocolos mais “agressivos”, como o executado por Casady; Myers e Legates (1952), alguns animais tornaram-se astenozoospermicos.

O tempo decorrido entre o aumento de temperatura testicular e a detecção no ejaculado de redução nos índices de motilidade espermática descritos na literatura são variáveis, com intervalos apontados de 7 dias (GABALDI, 1999), 10 a 15 dias (RAO, 1967), 15 a 18 dias (VOGLER; SAACKE; BAME, 1993), 28 dias (MEYERHOEFFER et al., 1985), 30 a 54 dias (SILVA e CASAGRANDE, 1976), ou imediatamente após a insulação (BONILLA et al., 2004). No presente trabalho a redução da motilidade foi detectada já na primeira colheita após a insulação, com dois dias após a retirada das bolsas insuladoras. Entretanto, o mínimo valor de motilidade para o grupo INSUL (15,00%) ocorreu com 23 dias após o término da insulação e o menor valor de motilidade para o grupo IbST (13,75%) ocorreu com 30 dias após o término da insulação.

Interessante notar também neste tópico a ocorrência de variação individual. Dos oito touros insulados, sete tiveram perfil de resposta semelhante, com valores de motilidade sendo reduzidos a níveis nulos ou próximos a zero entre a semana 9 e 10 do experimento. Entretanto, houve um animal (touro B3) sobre o qual a insulação

não foi tão efetiva, mesmo com as altas temperaturas de superfície escrotal apresentadas pelo animal durante a insulação (35,0°C, 33,6°C, 36,2°C e 35,4°C; média = 35,05 °C). Este touro em particular se mostrou bastante resistente à insulação e ao longo de todo experimento nunca apresentou valores de motilidade espermática menores que 40%. Por outro lado, maior sensibilidade entre todos os animais foi percebida no touro A151, que permaneceu azoospermico durante 4 semanas consecutivas, tendo apresentado durante a insulação temperaturas de superfície escrotal de 36,8°C, 34,2°C, 36,1°C e 35,9°C (média = 35,75°C).

Essas diferenças individuais de resposta a um mesmo estímulo, nesse caso representado por um estresse térmico, podem ser explicadas em parte pela expressão gênica e síntese de proteínas, as quais são desiguais entre os animais e estão vinculadas a seu código genético. Uma série de genes, como o *Tctex2*, o gene *Smy* e os genes de MMR (*mismatch repair*) são responsáveis por controlar o desenvolvimento morfológico do espermatozóide (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003), por manter os movimentos heliciformes dos flagelos (INABA; KAGAMI; OGAWA, 1999) e por reparar eventuais de erros no DNA. Da mesma forma, outros genes podem contribuir para que um animal possa ser mais resistente a determinados desafios, como o estresse térmico.

A queda de motilidade nos grupos INSUL e IbST e a manutenção de níveis constantes ao longo do tempo entre 60 e 70% para os grupos CONT e bST deixa claro o efeito negativo da insulação sobre o número de células móveis nos ejaculados dos animais insulados. A ascendência da curva de motilidade demonstrada pelos grupos insulados após a semana 10 demonstra retomada nos níveis de motilidade, os quais tenderam a se aproximar dos níveis pré-insulação, a

despeito da menor velocidade de recuperação demonstrada pelo grupo IbST. Porém, o bST não influenciou na motilidade entre os grupos.

O vigor espermático sofreu redução significativa, demonstrando que não somente o número de espermatozóides é diminuído tão logo se estabeleça um processo degenerativo testicular, mas também as características de movimentação das células e provavelmente seu metabolismo são alterados. A redução foi constatada com 23 e 30 dias após a insulação (grupos INSUL e IbST, respectivamente) e é concordante com trabalho de Meyerhoeffer et al. (1985), que relatou diminuição do vigor espermático 28 dias após a insulação. Os trabalhos de Gabaldi (1999) e Bonilla (2004) relatam diminuição no vigor mais rápida, em até sete dias após a insulação.

Apesar de ser um parâmetro subjetivo, constatou-se que o vigor foi sempre mais baixo entre as semanas 6 a 15 para os animais insulados. É possível que esta redução na força e na velocidade de movimentação dos espermatozóides esteja associada principalmente a defeitos morfológicos de cauda e peça intermediária, bem como à falha de atividade funcional que diminua a capacidade da célula em executar com maior eficiência sua movimentação voluntária.

De fato, durante as semanas de 6 a 9 (portanto, de 2 a 23 dias após o término da insulação), foram significativos os acréscimos de um ou mais dos seguintes defeitos morfológicos nos animais insulados: cauda enrolada na cabeça, cauda fortemente dobrada e implantação de peça intermediária abaxial, oblíqua ou retroaxial. Foram altamente significativos também os acréscimos de células sem potencial mitocondrial durante as semanas 7 a 9 (9 a 23 dias após a insulação), o que representa um menor número de células com plena capacidade de gerar a energia necessária para seu metabolismo e satisfatória movimentação.

Interessante seria se essas associações entre anomalias de conformação de cauda e peça intermediária, além dos parâmetros de função mitocondrial pudessem ser correlacionadas com informações mais objetivas como aquelas geradas pelos sistemas de análise computadorizada de sêmen e posteriormente associadas a teste de fertilidade *in vivo* ou *in vitro*.

Sendo uma função da motilidade e da concentração espermática, o movimento de massa (ou turbilhonamento) tende a decrescer sempre que um (ou ambos) desses fatores diminua. As diferenças mais significativas entre os animais insulados e os não insulados quanto ao turbilhonamento ocorreram entre as semanas 7 a 11, acompanhando concomitantemente os decréscimos já comentados na concentração espermática e na motilidade.

De fato, a inflexão negativa na curva de turbilhonamento é mais acentuada na semana 10, a qual é a semana de menores valores para concentração e motilidade espermática nos animais insulados.

6.6 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia espermática em animais submetidos ao estresse térmico testicular com conseqüente quadro de degeneração testicular instalado tem sido estudada ao longo de anos. Um quesito interessante de ser notado é referente à freqüência e ao tempo de ocorrência de patologias encontradas por outros autores.

Parkinson (1987) encontrou maiores incidências de espermatozóides com morfologia anormal de cabeça, cabeças isoladas, defeitos de peça intermediária,

defeitos de cauda e gotas citoplasmáticas. Já Kumi-Diaka; Nagaratnam e Rwuaan (1981) também detectaram maiores quantidades de espermatozóides com cabeça gigantes, implantação abaxial, caudas enroladas, gotas citoplasmáticas proximais e gotas citoplasmáticas distais.

Por sua vez, Gabaldi (1999) obteve aumento de defeitos de acrossomo, defeitos de cabeça (subdesenvolvida, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal, "*pouch formation*", isolada patológica, isolada normal, delgada, gigante e pequena), defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda (dobrada com gota, fortemente dobrada ou enrolada), além de gota protoplasmática proximal, gota protoplasmática distal e formas teratológicas, sendo que os níveis de defeitos retornaram ao normal no dia 148 após a insulação.

Ohashi et al. (1988) encontraram defeitos maiores nos touros taurinos, como defeitos de cabeça (38,6%), anomalias de acrossomo (12,4%) e *pouch formation* (7,8%). Rao (1967) percebeu alta incidência de gotas protoplasmáticas proximais (50%) e anomalias de cabeça (62%).

Em termos cronológicos de aparecimento de patologias, Vogler; Saacke e Bame (1993) obtiveram cabeças isoladas aparecendo em 12 dias (33,9%), defeitos de diadema no dia 18 (55,6%), vacúolos nucleares e cabeças piriformes no dia 21 (24,8% e 18,3%, respectivamente), *knobbed* acrossomo no dia 27 (11,8%) e Dag defeito no dia 30 (3,2%), retornando aos níveis basais em 39 dias após a insulação testicular.

Barth e Bowman (1994) encontraram os seguintes tempos de manifestação de patologias: cabeça isolada (9 a 11 dias após a insulação), gota protoplasmática proximal (10 a 13 dias), gota protoplasmática distal (11 dias), defeito de peça intermediária (11 a 13 dias), defeito na bainha mitocondrial (14 a 23 dias), *knobbed*

acrossomo (18 a 21 dias), vacúolos nucleares (18 a 25 dias), cabeça piriforme (20 a 29 dias), cabeça pequena (21 dias), formas teratológicas (23 dias), cauda enrolada (23 a 29 dias) e condensação anormal de DNA (28 a 30 dias).

No presente trabalho foram encontradas mais expressivamente anomalias de gota citoplasmática proximal (pico no dia 2 pós-insulação), cauda dobrada com gota (pico no dia 2 pós-insulação), cabeça isolada normal (pico no dia 9 pós-insulação), cabeças piriformes (pico no dia 16 pós-insulação), cauda enrolada na cabeça (pico no dia 23 pós-insulação) e cauda fortemente dobrada (pico no dia 2 para grupo INSUL e no dia 23 para o grupo IbST).

Os defeitos menores apresentaram pico em 9 dias após o término da insulação, enquanto os defeitos maiores apresentaram pico em 23 dias pós-insulação. O total de defeitos teve pico em 23 dias após a insulação. Apesar de numericamente não ser o defeito mais ocorrente, as cabeças piriformes chamam atenção pelo fato de que, quando há alteração de forma da cabeça, há intrinsecamente uma alteração prévia de forma do núcleo ou na distribuição de cromossomos durante a meiose (BARTH e OKO, 1989).

Diferenças no percentual de espermatozóides anormais ao longo das 22 semanas ocorreram exclusivamente devido ao efeito da insulação, sendo que o bST não apresentou efeito significativo sobre as variáveis de defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais.

6.7 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Antes de verificar os possíveis efeitos dos tratamentos sobre as características em questão, é salutar a consideração de uma questão recente. A integridade da membrana plasmática foi verificada através da utilização do iodeto de propídio, um fluorocromo impermeável à membrana plasmática, que se acopla ao DNA de espermatozóides de apresentem membrana danificada (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999).

Contrariamente ao que alguns autores indicam, entende-se que a coloração positiva pelo PI não significa que os espermatozóides corados com iodeto de propídio estejam necessariamente mortos. Isso porque qualquer agente físico ou químico que promova instabilidade estrutural na bicamada lipídica pode potencialmente expor o espermatozóide à coloração com o PI, mesmo sem este ter finalizado um processo de necrose ou apoptose.

Devido a estas questões, a expressão “viabilidade espermática” tem sido atualmente discutida, com alguns autores associando seu uso à simples ausência de coloração com o PI, quando, em teoria, esta ausência de coloração não significa por si só que uma célula seja “viável” para a fecundação. Sob uma perspectiva mais global, uma célula viável para a fecundação seria aquela capaz de se deslocar pelo trato reprodutivo feminino, de realizar o processo de capacitação espermática, de se ligar à zona pelúcida, penetrar o ovócito, participar da singamia e permitir ao zigoto as primeiras clivagens de modo normal. Consideramos a população de espermatozóides MIAI-CP a que se enquadra nesses quesitos.

Assim, as referências feitas neste trabalho às células coradas com PI significam que as mesmas têm “membrana plasmática lesada”, sem necessariamente estar vinculada a esta coloração a condição de verificação de células vivas ou mortas, nem mesmo à condição de viáveis ou inviáveis para a fecundação.

Durante as cinco primeiras semanas de experimento, a taxa de espermatozoides com membrana plasmática lesada para os dezesseis touros variou entre $44,19 \pm 3,98\%$ (semana 1) e $31,06 \pm 3,85\%$ (semana 4). Complementarmente, os índices de espermatozoides com membrana citoplasmática íntegra antes do início da insulação variaram entre 55,81% e 68,94%. Relembrando a taxa de variação da motilidade apresentada no mesmo período pelos animais em questão, verifica-se que estes tiveram índice de 70,00% e 68,44%, respectivamente para as semanas 1 e 4. Desta feita, percebe-se que em algumas situações há células com motilidade mas que apresentam membrana citoplasmática lesada (70,00% de motilidade com 55,81% de células com membrana plasmática íntegra).

Durante as semanas 7 a 13 foi demonstrado evidente efeito da insulação testicular sobre o número de espermatozoides com membrana plasmática lesada. Esse efeito se deve às alterações de ambiente no interior dos túbulos seminíferos, que provavelmente modifica o metabolismo de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides, além de possivelmente influenciar na produção e liberação dos fatores parácrinos e autócrinos produzidos nas células de Sertoli e Leydig, necessários para a manutenção normal da espermatogênese.

Além disso, a alteração no microambiente da espermatogênese pode levar à quimiotaxia de células inflamatórias, e maior produção de espécies reativas de

oxigênio que desestabilizam a membrana plasmática e influenciam na capacidade fecundante do espermatozóide (AITKEN; BAKER, 1995; WOLFF, 1995).

Relativamente à integridade de acrossomo, saliente-se que os níveis detectados para a população dos dezesseis touros, os quais eram touros potencialmente férteis segundo os critérios do CBRA (1998), variavam entre 17,59% e 24,81% antes do início da insulação testicular. Deste modo, a utilização de uma técnica específica para lesão de acrossomo, como a tripla coloração de Arruda e Celeghini (2004) permite constatar que os índices de lesão de acrossomos para sêmen a fresco em touros normais já são, antes de qualquer intervenção, relativamente altos. A partir de então, qualquer técnica de manipulação de gametas (resfriamento, congelação, sexagem, injeção intracitoplasmática de espermatozóides) pode aumentar os índices de lesão e, portanto, diminuir a capacidade fecundante dos espermatozóides.

Eventos patológicos, como o estresse térmico testicular seguido de degeneração, também podem aumentar os índices de lesão acrossomal. A insulação foi um potente indutor de lesões, com os índices dos animais insulados chegando próximos da faixa de 40 a 50% em algumas circunstâncias (semana 12, grupo INSUL e semana 7, grupo IbST).

Os resultados de células sem potencial mitocondrial sofreram efeito de tempo e da interação tempo X insulação. Durante as semanas 2 a 5 do experimento, os níveis médios foram baixos, entre 5,00 e 6,00%, período durante o qual a motilidade aferida em microscopia óptica variou entre 69,06 e 72,19%. Desta forma, deduz-se que podem ocorrer duas situações distintas: há células que permanecem com potencial mitocondrial, porém não elevado o suficiente para demonstrarem movimentação ativa (o que talvez pudesse pressupor um estágio final da vida

celular) ou que exista uma porcentagem de células com movimentos de mínima amplitude, cujo trajeto não seja possível de detectar visualmente utilizando a microscopia óptica.

Para aumentar a especificidade da análise, é interessante conjugar, portanto, as três características em questão (integridade de membrana plasmática + integridade de acrossomo + função mitocondrial), concentrando atenção sobre a categoria aqui denominada de MIAI-CP (células que apresentam membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial).

Ao observar as médias para as cinco semanas pré-insulação testicular, nota-se que o nível normal de células MIAI-CP para a população de touros estudada esteve na faixa de 60,00% a 65,00%. Isso significa que, ao conjugar os três fatores de interesse, aproximadamente 40,00% das células não possuíam, a princípio, condição de participar do processo de fertilização com alguma chance de sucesso.

Com o estabelecimento da insulação, apesar do total de defeitos detectado pela análise em microscopia de fase apontar para um acréscimo, especialmente na semana 9 (78,75% no INSUL e 73,75% no IbST), a microscopia de epifluorescência permitiu diagnosticar uma população de espermatozóides VAIC da ordem de 6,50% para INSUL e 10,38% para IbST. Ou seja: houve uma população marginal com morfologia normal, porém inadequada funcionalmente à fecundação que deixou de ser detectada nas análises convencionais (14,75% no INSUL e 15,87% no IbST), mas o foi na microscopia de epifluorescência. Mais surpreendente foi o mesmo diagnóstico para os animais não insulados: foram 8,63% e 11,25% de defeitos totais nos grupos CONT e bST, respectivamente, para 61,25% e 57,13% de espermatozóides VAIC detectados. Desta forma, a população marginal não detectada foi de 30,12% no grupo CONT e 31,62% no grupo bST.

Desta forma, há indícios, como os apontados por Arruda e Celeghini (2004), de que a técnica de análise da funcionalidade dos compartimentos espermáticos, que neste caso considera de interesse a população de células VAIC, poderia ser incorporada à rotina de avaliação andrológica pela sua especificidade.

Como não houve efeito da interação tempo X bST nem da interação tempo X insulação X bST, os efeitos do bST isoladamente não se mostraram significativos para a população de células VAIC.

6.8 INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA

Associando conceito descrito por Januskauskas; Johannisson e Rodriguez-Martinez (2003), a exposição da fosfatidilserina pela membrana plasmática do espermatozóide está relacionada com alteração na sua função. Este fator, por vezes se correlaciona positivamente à condensação anormal de cromatina espermática, visto que a célula neste processo pode entrar em necrose celular.

Sabe-se que a porcentagem de espermatozóides com estrutura anormal de cromatina é relacionada à fertilidade (BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988) e o teste de estrutura da cromatina possui correlação significativa com a fertilidade de touros (BOCHENEK; SMORAG; PILCH, 2001).

Os níveis de fragmentação da cromatina no presente estudo estiveram, antes da insulação testicular ser desencadeada, abaixo de 2,00%, com apenas um episódio registrado com nível superior a esse (grupo INSUL, semana 4). Apesar de serem dados de animais criados a campo, estes resultados estão bem abaixo do

índice de 23,8% de espermatozóides com defeitos de cromatina para touros usados em centrais de inseminação artificial (BOCHENEK; SMORAG; PILCH, 2001).

Como as médias semanais para os dezesseis touros antes da insulação foram menores que 1,00% para os grupos, este valor foi tomado com referência para a indicação de retorno ao estado normal de fragmentação do DNA.

O aumento do número de células com fragmentação da cromatina nos grupos INSUL e IbST na semana 9, ou seja, 23 dias após ao final da insulação, se aproxima do tempo relatado por Barth e Bowman (1994). Esse quadro está associado possivelmente ao efeito que a própria insulação determinou nos espermatozóides que se encontravam em fase de trânsito final ou armazenados no epidídimo, pois este intervalo de tempo parece curto para que células afetadas durante a espermatogênese pudessem demonstrar falha estrutural na cromatina.

Apesar de não ter havido efeito significativo da interação tempo X bST e da interação tempo X insulação X bST, chama a atenção o retorno mais lento do grupo insulado e que recebeu bST aos níveis pré-insulação durante a fase tratamento (semanas 10 a 17). Esse mesmo fenômeno foi observado também durante a fase tratamento para a variável “espermatozóides sem potencial mitocondrial”.

No presente ensaio, devido à metodologia empregada, que foi baseada no uso da microscopia de epifluorescência para a detecção da fragmentação de DNA, não foi possível estabelecer os níveis de α_1 . O α_1 é a relação entre o número de células com fluorescência em vermelho e o número total de células com fluorescência e é útil para a quantificação da desnaturação do DNA, conforme preconizado por Evenson (1980). Segundo este autor, o nível do α_1 é próximo de 0,1 para touros férteis e de 0,9 para touros subférteis. Para calcular o α_1 , a citometria de

fluxo seria o método de eleição, por permitir a análise de um número expressivamente maior de células em curto intervalo de tempo.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais realizadas, pode-se concluir que:

1) A temperatura retal, a temperatura da superfície escrotal e a consistência testicular não são influenciadas pelo estresse térmico testicular nem pelas aplicações de somatotropina recombinante bovina.

2) O perímetro escrotal é influenciado negativamente pelo estresse térmico testicular, porém não é influenciado pela ação da somatotropina bovina.

3) A concentração espermática e o pH não são influenciados pela ação do estresse térmico testicular nem pela ação da somatotropina recombinante bovina.

4) A motilidade espermática e o vigor são influenciados negativamente pelo estresse térmico testicular, porém não sofrem o efeito da somatotropina bovina.

5) O movimento de massa é influenciado negativamente pelo estresse térmico testicular, mas não pela somatotropina bovina.

6) O estresse térmico testicular incrementa a quantidade de: acrossomos lesados, gota protoplasmática proximal, cauda enrolada na cabeça, cabeça estreita na base, cabeça pequena anormal, contorno anormal de cabeça, *pouch formation*, cauda fortemente dobrada, cauda dobrada com gota, cabeça isolada normal e implantação abaxial. Essas variáveis não sofrem efeito da somatotropina.

7) As gotas protoplasmáticas distais, caudas dobradas ou enroladas e patologias de peças intermediárias não são influenciadas nem pelo estresse térmico testicular nem pela ação da somatotropina bovina.

8) A porcentagem de cabeças isoladas patológicas é incrementada pelo estresse térmico testicular, mas não pela ação da somatotropina bovina.

9) A porcentagem de cabeças piriformes é influenciada pela insulação, pela ação da somatotropina bovina e pela interação de ambos.

10) O total de defeitos maiores, total de defeitos menores e o total de defeitos espermáticos são influenciados pelo efeito do estresse térmico testicular, mas não pela ação da somatotropina bovina.

11) A estrutura da cromatina, a integridade de membrana plasmática, a lesão de acrossomo e a ausência de potencial mitocondrial são influenciadas pelo estresse térmico testicular, mas não pela somatotropina bovina.

12) A população de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial é reduzida em função do estresse térmico testicular, porém não é influenciada pela ação da somatotropina bovina.

Referências

REFERÊNCIAS

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

AITKEN, R. J. The Amoroso Lecture: The human spermatozoon – a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 1-7, 1999.

AITKEN, R. J.; BAKER, H. W. G. Seminal leukocytes: passengers terrorists or good samaritans? **Human Reproduction**, v. 10, p. 1736-739, 1995.

AL-HABOBY, A. H.; LOSETH, K. J.; WHEATON, J. E.; CRABO, B. G. Neonatal hemiorchidectomy of bulls alters plasma growth hormone levels and advances onset of pubertal testosterone secretion. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 5, p. 61-69, 1988.

ANDERSON, B. E. Regulação da temperatura e fisiologia ambiental. In: SWENSON, M. J. (Ed.). **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap. 45. p. 623-629.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000, 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 230-231, 2003. Suplemento.

AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R. L. Effect of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, p. 307, 1961.

AX, R. L.; GILBERT, G. R.; SHOOK, G. E. Sperm in poor quality semen from bulls during heat stress have a lower affinity for binding hydrogen-3 heparin. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 1, p. 195-200, 1987.

BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKKE, R. G. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 2, p. 109-115, 1988.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. p. 130-270.

BARTLETT, J. M. S.; CHARLETON, H. M.; ROBINSON, I. C. A. F.; NIESCHLAG, E. Pubertal development and testicular function in the male growth hormone-deficient rat. **Journal of Endocrinology**, v. 126, p. 193-201, 1990.

BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673-677, 1988.

BLOM, E. The evaluation of bull semen with special reference to its use in artificial insemination. **Animal Breeding Abstracts**, v. 19, p. 648, 1950.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination, **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.

BONILLA, L.; GUIMARÃES, J. D.; SANTOS, A. Q.; BORGES, J. C.; GURZONI, W. S.; ZAMPELINI, B. Effects of scrotal insulation on the physical and morphological characteristics of bovine semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte:CBRA, 2004. p. 237.

BONSMA, J. Breeding cattle for increased adaptability to tropical and sub-tropical environment. **Journal of Agricultural Science**, v. 39, p. 204, 1949.

BORG, K. E.; ESBENSHADE, K. L.; JOHNSON, B. H. Cortisol, growth hormone, and testosterone concentrations during mating behavior in the bull and boar. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 8, p. 3230-3240, 1991.

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 growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. **Endocrinology-Philadelphia**, v. 137, n. 9, p. 4061-4064, 1996.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls., **Animal Reproduction Science**, v. 79, p.1-15, 2003.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A. G.; KASTELIC, J. P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil., **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3/4, p. 181-190, 2002.

BURFENING, P. J.; ULBERG, L. C. Embryonic survival subsequent to culture of rabbit spermatozoa at 38° and 40° C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 15, p. 87-92, 1968.

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, n. 1, p. 14-23, 1952.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBNIS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.

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

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; FUKUDA, M.; BEHBOODI, E. Determining acrosomal status of the cynomolgous monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy, **American Journal of Primatology**, v. 17, p. 157-163, 1989.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-226, 1986.

ELLIOT, D. J.; COOKE, H. J. The molecular genetics of male infertility. **Bioessays**, v. 19, n. 9, p. 801-809, 1997.

ERB, R. E.; ANDREWS, F. N.; HILTON, J. H. Seasonal variation in semen quality of the dairy bull. **Journal of Dairy Science**, v. 25, p. 815-826, 1942.

EVENSON, D. P. Flow citometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.). **Flow Citometry**: advanced research and clinical applications. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1980. p. 217-246.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

FOSSA, S. D.; DE ANGELIS, P.; KRAGGERUD, S. M.; EVENSON, D.; THEODORSEN, L.; CLAUSEN, O. P. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. **Cytometry**, v. 30, n. 4, p. 192-196, 1997.

FRANÇA, L. R.; PAULA, T. A. R.; CHIARINI-GARCIA, H. Testis histometric evaluation and sperm production in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN SOCIETY OF ANDROLOGY, 23., Long Beach. **Proceedings...**, 1998. p. 47.

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

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds.). **Reprodução animal**. Barueri: Manole, 2004. p. 97-110.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 34, p. 399-404, 1999.

GLEDHILL, B. L. Further studies on the nuclear chromatin of morphologically abnormal bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, n. 3, 431-434, 1972.

GLEDHILL, B. L.; DARZYNKIEWICZ, Z.; RINGERTZ, N. R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull: increased [³H]actinomycin D binding to nuclear chromatin of morphologically abnormal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 26, p. 25, 1971.

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. 71-76, 1997.

GRECO, D.; STABENFELDT, G. H. O sistema endócrino, Capítulo 32. In: CUNNINGHAM, J. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 309-323.

GREEP, P. O. The male reproductive system. In: GREEP, R. O.; KOBLINSKY, M. A.; JAFFE, F. S. (Ed.). **Reproduction and human welfare**. Cambridge: MIT Press, 1976. p. 165-277.

HAUGLAND, R. P. Probes for organelles. In: SPENCE, M. T. Z. (Ed.). **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 6. ed. Eugene: Molecular Probes, 1996. cap. 12, p. 266-271.

HEINDEL, J. L.; TREINEM, K. S. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. **Toxicologic Pathology**, v. 17, p. 411-445, 1989.

HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; MACIE, M. N. Variação temporal na qualidade do sêmen de touros de genótipo puro europeu e sintético derivado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 324-330, 2002.

HUHTANIEMI, H.; TOPPARI, J. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. In: MUKHOPADHYAY, A. K.; RAIZADA, M. K. (Ed.). **Tissue renin-angiotensin systems**. Nova Iorque: Plenum Press, 1995. p. 33-54.

HULL, K. L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in male reproduction. **Endocrine**, v. 13, n. 3, p. 243-250, 2000.

HUSZAR, G.; VIGUE, L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 71-77, 1994.

INABA, K.; KAGAMI, O.; OGAWA, K. Tctex2-related outer arm dynein light chain is phosphorylated at activation of sperm motility. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 256, n. 1, p. 177-183, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SÖDERQUIST, L.; LUNDEHEIM, N. Effects of a brief elevation of scrotal temperature on the post-thaw viability of bull semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 30, p. 271-277, 1995.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in Cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JOHANISSON, E.; CAMPANA, A.; LUTHI, R.; AGOSTINI, A. Evaluation of "round cells" in semen analysis: a comparative study. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 4, p. 404-412, 2000.

JOHNSON, W. H. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 255-270, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 355-366.

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; KAPROTH, M. T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3836-3848, 1991.

KASTELIC, J. P. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 271-282, 1997.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996.

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.

KENAN, D. J.; QUERY, C. C.; KEENE, J. D. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, n. 16, p. 214-220, 1991.

KOOPMAN, P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 6-7, p. 839-856, 1999.

KUDRYAVTSEV, I. V.; SAFRONOVA, L. D.; KUDRYAVTSEV, P. I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, n. 6, p. 337-346, 2003.

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **The Veterinary Record**, v. 108, n. 3, p. 13-15, 1981.

LAGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**, v. 33, n. 12, p. 550-561, 1938.

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, 1996.

MACDONALD, R. D.; DEEVER, D. R. Testicular development in bulls treated with recombinant bovine somatotropin. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1540-1544, 1993.

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

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. Belo Horizonte: CVP Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. 586 p.

MATSUMOTO, A. Hormonal control of spermatogenesis. In: BURGER, H.; DE KRETZER, D. (Ed.). **The testis**. 2. ed. Nova Iorque: Raven Press, 1989. p. 181-196.

MCANDREWS, J. M.; STROUD, C. M.; MACDONALD, R. D.; HYMER, W. C.; DEEVER, D. R. Age-related changes in the secretion of growth hormone in vivo and in vitro in infantile and prepubertal Holstein bull calves. **Journal of Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 307-315, 1993.

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, n. 1, p. 1-9, 1996.

MERCIER, E.; SALISBURY, G. W. Fertility level in artificial breeding associated with season, hours of daylight and the age of cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 3, p. 817-826, 1947.

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.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1977. p. 409-414; 517-524.

MITCHELL, M. J.; AGULNIK, A. L.; BISHOP, C. E. Genes on the mouse Y chromosome. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, n. 4, p. 397, 1994.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 15-43.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 93-104.

OH, S. S.; KHARDORI, 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.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *Bos taurus* e mestiços criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 31-35, 1988.

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**, v. 42, n. 6, p. 817-820, 1995.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, p. 787-794, 1988.

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.

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, n. 11, p. 1869-1872, 1993.

OVESEN, P. G.; JORGENSEN, J. O.; INGERSLEV, J.; ORSKOV, H.; CHRISTIANSEN, J. S. Growth hormone treatment of men with reduced sperm quality. **Ugeskr Laeger**, v. 160, n. 2, p. 176-180, 1998.

PARKINSON T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: correlation with environmental temperature. **The Veterinary Record**, v. 120, n. 20, p. 479-482, 1987.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PILDER, S. H.; HAMMER, M.; SILVER, L. M. A novel mouse chromosome 17 hybrid sterility locus: implication for the origin of T haplotypes. **Genetics**, v. 129, p. 237-246, 1991.

PINHO, T. G.; NOGUEIRA, L. A.; CASTRO, R. P. R.; MARQUES, D. M.; MONTEIRO, A. B. S. Semen quality and scrotal circumference of *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls extensively managed in tropical environment in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 197.

RAO, A. R. Experimental testicular degeneration in a bull. **The Indian Veterinary Journal**, v. 44, n. 12, p. 1022-1024, 1967.

REDKAR, A. A.; OLDS-CLARKE, L.; DUGAN, L. M.; PILDER, S. H. High-resolution mapping of sperm function defects in the T complex fourth inversion. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 10, p. 825-880, 1998.

ROBERTS, S. J. Infertility in male animals (Andrology). In: ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. Woodstock: VT, 1986. p. 752-893.

ROMANIENKO, P. J.; CAMERINI, R. D. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. **Molecular Cell**, v. 6, p. 975-987, 2000.

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

SAACKE, R. G. Components of semen quality. **Journal of Animal Science**, v. 55, p. 1-13, 1982. Suplemento 2.

SAACKE, R. G. Semen quality in relation to semen preservation. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2635-2644, 1983.

SAACKE, R. G.; NADIR, S.; DALTON, J.; BAME, J.; DEJARNETTE, J. M.; DEGELOS, S.; NEBEL, R. L. Accessory sperm evaluation and bull fertility – an update. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 15., EUA. **Proceedings...** Milwaukee: National Association of Animal Breeders, 1994. p. 57-67.

SANTOS, R. L.; SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. F. C.; VASCONCELOS, A. C.; PESQUERO, J. L.; COELHO, S. G.; SERAKIDES, R.; REIS, S. R. Effect of growth hormone and induced IGF-1 release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. **Theriogenology**, v. 51, n. 5, p. 975-984, 1989.

SAS Institute Raleigh, USA. **SAS user's guide statistics 89**. Raleigh : SAS, 1989.

SATRAPA, R. **Correlação das diferenças entre as temperaturas retais e escrotais e a qualidade do sêmen de touros zebus (*Bos taurus indicus*)**. 1992. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

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, n. 1, p. 145-158, 2000.

SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P. T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 221-250.

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

SETCHELL, B. P. The scrotum and thermoregulation. In: SETCHELL, B. P. (Ed.). **The mammalian testis**. Ithaca: Cornell University Press, 1978. p. 90-108.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. Nova Iorque: Raven Press, 1994. p. 1363-1434.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; 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.; CASAGRANDE, J. P. Influence of high environmental temperatures on some characteristics of zebu bull semen. In: CONGRESSO INTERNACIONAL EM REPRODUÇÃO ANIMAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, 8., 1976, Cracóvia. **Anais...** Local de publicação: editora, 1976. p. 939-942.

SILVA JÚNIOR, V. A.; FRANÇA, L. R. Células de Leydig e esteroidogênese em mamíferos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 35, p. 15-29, 2001.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 2, p. 1784-1790, 1966.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos reprodutivos no macho, In: SWENSON, M. J. (Ed.). **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap. 50, p. 719-730.

SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46, n.1-2, p. 89-96, 1997.

SUN J. G.; JURISICOVA, A.; CASPER, R. F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 602-607, 1997.

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.

SWANSON, E. W.; HERMAN, H. A. Seasonal variation in semen quality of some Missouri dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 27, p. 303-310, 1944.

TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN, A.; MARIK, J. J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, n. 1, p. 87-91, 1984.

TRENKLE, A.; WILLHAM, R. L. Beef production efficiency. **Science**, v. 198, n. 12, p. 1009-1011, 1977.

UNANIAN, M. M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

VALE FILHO V. R.; MEGALE, F.; ABREU, J. J.; PINTO, P. A.; FONSECA, J. Distúrbio da reprodução em touros Nelore, Gir, Guzerá, Indubrasil, comparativamente com touros das raças Holandês, Charolês, e Chianina criados nas mesmas condições. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1981. p. 8.

VAN CAMP, S. D. Common causes of infertility in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 203-231, 1997.

VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1207-1219, 1993.

WABERSKI, D.; KHALIL, A. Y. Y.; ARDON, F.; MAGNUS, F.; HELMS, D.; WRENZYCKI, A. M.; PETRUNKINA, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm-oviduct binding in bull and boar and its relation to chromatin stability, sperm volume regulation and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro **Workshops Communications**. Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 470.

WAITES, G. M. H. Temperature regulation and the testis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDERMARK, N. L. (Ed.). **The testis**. Nova Iorque: Academic Press, 1970. p. 241-279.

WAY, A. L.; HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculate and cauda epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1301-1316, 1995.

WENKOFF, M. S. **The evaluation of bulls for breeding soundness**. Ontário: Canadian Veterinarian Medical Association, 1988. 48 p.

WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K. W. Spermogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* X *Bos taurus* bulls after scrotal insulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, n. 2, p. 711-716, 1983.

WOLFF, H. The biological significance of white blood cells in semen. **Fertility and Sterility**, v. 63, p. 1143-1154, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1

PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPONADA DE FORMOL SALINO

Componentes:

- Na_2HPO_4 1,682g
- KH_2PO_4 22,254g
- NaCl 9,01g
- Formalina comercial..... 62,5mL
- H_2O destilada e deionizada (q.s.p.) 1700mL

Preparo:

1) Preparo da Solução Estoque Tampão:

- Solução A: diluir o Na_2HPO_4 (21,682g) em água destilada deionizada (q.s.p. 500mL).
- Solução B: diluir o KH_2PO_4 (22,254g) em água destilada e deionizada (q.s.p. 500mL)
- Misturar 200mL da Solução A e 80mL da Solução B. Destes 280 mL, retirar 100mL para o preparo da solução de trabalho.

2) Preparo da Solução Estoque de NaCl:

- Diluir o NaCl (9,01g) em água destilada e deionizada (q.s.p. 500mL).

3) Preparo da Solução de Trabalho:

- combinar 100 mL da Solução Estoque Tampão e 150 mL da Solução Estoque de NaCl .
- Adicionar 62,5 mL de formalina comercial.
- Completar com 187,5 mL de água destilada e deionizada.
- Manter a solução final refrigerada a 5°C.

ANEXO 2

COLORAÇÃO FLUORESCENTE PARA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL (baseado em ARRUDA; CELEGHINI, 2003)

Componentes:

• TALP	10 mL
• DMSO	1,3 mL
• DPBS	3,2 mL
• Iodeto de Propídio (PI)	1,682g
• Lecitina conjugada de Pisum sativum aglutinina (PSA)	22,254g
• Mito Tracker® Green FM	9,01g

Preparo:

1) Preparo da Amostra:

- Diluir o sêmen em TALP, ajustando a concentração para 25×10^6 spz/mL.
- Colocar 150 µL de sêmen diluído em microtubo de 2 mL.
- Adicionar 1 µL de PI (3 mM).
- Adicionar 1 µL de MITO (500 µM em DMSO).
- Adicionar 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS).
- Incubar por 8 minutos a 38,5° C.
- Avaliar 200 espermatozoides sob imersão em microscopia de epifluorescência (filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm).

Resultado:

- PI Positivo: núcleo corado de vermelho.
- PSA positivo: região do acrossomo corada de verde-amarelado.
- MITO Positivo: região da bainha mitocondrial corada de verde intenso.

ANEXO 3

COLORAÇÃO FLUORESCENTE PARA AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE ESTRUTURA DA CROMATINA (baseado em UNANIAN, 2000)

Componentes:

- Fluorocromo “Acridina Laranja” $C_{17}H_{20}ClN_3$ 3,6-bis (dimethylamino) acridine hydrochloride zinc chloride double salt; 3,6-Hemi(zinc chloride)-bis (dimetilamino) acridinium chloride hemi (zinc chloride salt) mL
- Ácido Cítrico..... 5,25g
- Fosfato Dissódico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 20,10g
- Metanol 300 mL
- Ácido acético 100 mL
- H_2O destilada e deionizada (q.s.p.) 1500mL

Preparo:

1) Preparo da Solução estoque de Acridina Laranja (AO):

- diluir 1 g de acridina laranja para 1000 mL; após preparada, manter em frasco âmbar a 4°C.

2) Preparo da Solução Estoque de Ácido Cítrico

- preparar solução 0,1Molar (5,25g de ácido cítrico para 250 mL de água dd); guardar solução à temperatura ambiente.

3) Preparo da Solução Estoque de Fosfato Dissódico

- preparar solução 0,3Molar (20,10g de fosfato dissódico para 250 mL de água dd); guardar à temperatura ambiente.

4) Preparo da Solução de Carnoy

- misturar 300 mL de metanol e 100 mL de ácido acético imediatamente antes de iniciar a fixação de algum esfregaço.

5) Preparo das Amostras

- Após coleta do sêmen, centrifugar o material a 2000 RPM por 5 minutos.
- Lavar o sêmen com água destilada, por centrifugação, até obter sobrenadante limpo (repetir o procedimento por 2 ou 3 vezes).
- Ressuspender o *pellet* em água destilada para obter concentração de 50 a 100 x 10⁶ spz/ml.
- Preparar o esfregaço em lâmina de vidro seca, limpa e desengordurada.
- Secar o esfregaço a temperatura ambiente por pelo menos 60 minutos.
- Mergulhar completamente as lâminas em solução de Carnoy e deixar fixar durante 12 horas (*overnight*).
- Secar a lâmina à temperatura ambiente.

6) Preparo da Solução de Coloração de Acridina Laranja:

- Fazer a solução de coloração:
 - o 10ml da solução estoque de AO
 - o 40 ml da solução de ácido cítrico 0,1Molar
 - o 2,5 ml da solução de fosfato dissódico 0,3 Molar
- Checar o pH da solução, o qual deve estar entre 2 a 3 e proteger a solução contra incidência de luz
- OBS: esta solução deve ser preparada e usada imediatamente (não usar solução preparada em dias anteriores ou mesmo após algumas horas)

7) Coloração dos Esfregaços:

- Cobrir o esfregaço com cerca de 3 mL da solução de coloração.
- Deixar corar por 5 minutos.
- Lavar gentilmente o esfregaço em água destilada.
- Colocar lamínula antes de permitir secar o esfregaço.
- Secar o esfregaço.
- Fechar área da lamínula com esmalte para evitar evaporação.
- OBS: Todo procedimento de coloração e montagem da lâmina devem ser feitos em ambiente escuro.

8) Observação e Contagem dos Espermatozóides

- Examinar o esfregaço em microscópio de fluorescência, filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm, em aumento de 1000 x.
- Avaliar no mínimo 500 células.

Resultado:

- Células com fluorescência verde: normais, com DNA íntegro.
- Células com fluorescência vermelha, laranja, amarela ou seus subtons: anormais, com DNA fragmentado.
- Células que emitiram fluorescência verde, porém com gotas citoplasmáticas proximais coradas em vermelho: normais.