

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MORFOLOGIA DO CROMOSSOMO Y, FUNÇÃO GONADAL E
EXTRAGONADAL EM TOUROS DE RAÇAS SINTÉTICAS COM ALTERAÇÕES
NA QUALIDADE DO SÊMEN

Marilise Mesquita Horn

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução Animal

Orientador: Dr. José Carlos Ferrugem Moraes

Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MORFOLOGIA DO CROMOSSOMO Y, FUNÇÃO GONADAL E
EXTRAGONADAL EM TOUROS DE RAÇAS SINTÉTICAS COM ALTERAÇÕES
NA QUALIDADE DO SÊMEN

Marilise Mesquita Horn

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução Animal

Porto Alegre
2002

APROVADO POR

Prof Cláudio Alves Pimentel
Membro da Banca

Prof. David Driemeier
Membro da Banca

Prof. Thales Renato Freitas
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Estes estudos foram desenvolvidos com a colaboração dos departamentos de Patologia Animal da Faculdade de Veterinária, do departamento de Genética da Faculdade de Biologia, do departamento de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Também contou com as facilidades da Embrapa Pecuária Sul, Bagé. A bolsa de estudos foi fornecida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e parte do financiamento do projeto foi obtido pelo programa MCT-PRONEX.

Meus agradecimentos vão para:

Meu orientador José Carlos Ferrugem Moraes, pela irreparável conduta em auxiliar-me a desenvolver a arte de pensar criticamente sobre pesquisa. Durante estes anos de convivência posso dizer que aprendi muito, e muito do que agora represento, certamente devo a este professor.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Isabel Edelweiss, por estar sempre pronta a ajudar com novas idéias, bom astral e positivismo, a ti Mie, meu muito obrigada pela acolhida imediata e verdadeira.

À Flávia Giusti Grossmann, tecnóloga do Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por me ajudar e me ensinar muitas coisas de um mundo novo para mim. Obrigada pela ajuda incondicional. Da mesma maneira à Neiva Copetti, pela amizade e pela partilha de conhecimentos.

Às tecnólogas do Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária, Ângela e Marília, pela alegria e constantes ajudas a ensinar-me “tudo” sobre a preparação de blocos de parafina e coloração de HE!

Às amigas do Pós-graduação da Faculdade de Veterinária, Carmen Lúcia, Verinha, Simone e Andréia, por permitirem que eu invadisse o PG sempre e a qualquer hora, para pesquisar na internet. Obrigada pela tolerância e verdadeira amizade.

Aos médicos veterinários Valter José Pötter, Adriano Rosado, Nei Macedo, Sérgio Tellechea pela colaboração e confiança no nosso trabalho. Aos médicos veterinários João Guilherme Schumacher, Carlos Galina e Carlos Jaume, por sempre torcerem por mim.

À professora Rosemari Oliveira pelas orientações na parte de histoquímica no início destes estudos, também aos colegas Luis Gustavo Corbellini, Sandra Mara Fiala, Magda Vieira, pela amizade e constantes ajudas.

À Elis, por ser a mola, que as vezes me faz subir e outras descer, mas que fundamentalmente me fez entender a vida de uma maneira mais completa. E a Paulo, agradeço por ter participado indiretamente deste estudo, dando a tranqüilidade necessária para minha dedicação.

A meus queridos pais e irmãs, por tudo que pude me transformar a partir do que eles me proporcionaram, espero ter alcançado as suas expectativas.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- Introdução e Revisão Geral de Literatura.....	7
<i>Raças sintéticas no Brasil</i>	7
<i>A predição da fertilidade</i>	8
<i>Fertilidade nos touros sintéticos</i>	11
<i>A morfologia do cromossomo Y nos touros de raças sintéticas</i>	12
<i>Controle da espermatogênese no nível genético, parácrino e imunológico</i>	13
<i>Introdução aos estudos</i>	15
CAPÍTULO 2- Variação temporal na qualidade do sêmen de touros de genótipo puro europeu e sintético derivado.....	17
CAPÍTULO 3- The reproductive deficiency of bulls of synthetic breeds according to the morphology of the Y chromosome and the type of crossbreeding.....	29
CAPÍTULO 4- Evidência de seleção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogênese.....	40
CAPÍTULO 5- Quantificação dos estádios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com qualidade de sêmen normal ou alterada.....	54
CAPÍTULO 6- Quantifying the overexpression of TGF α (<i>transforming growth factor alpha</i>) in germinative cells and S100 proteins in Sertoli cells, in bulls of synthetic breed with deficient seminal quality.....	64
CAPÍTULO 7- Discussão geral e Conclusões gerais.....	79
Referências Bibliográficas.....	87
Resumo.....	98
<i>Abstract</i>	100
<i>Curriculum vitae resumido</i>	101

CAPÍTULO 1

Introdução e Revisão de Literatura

Raças sintéticas no Brasil

As raças bovinas sintéticas foram formadas no século passado e representam uma possibilidade de obter maior produtividade na exploração pecuária, graças a complementariedade natural entre os animais dos grupos genéticos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Além disto, o cruzamento em gado de corte, assim como em outras espécies de animais explorados economicamente, tem como consequência a combinação de méritos genéticos de diferentes raças em um único indivíduo, e a possibilidade de incorporação de material genético desejável de forma rápida (Euclides Filho, 1997). A capacidade do Zebu de prosperar sob condições adversas em combinação com as qualidades tão conhecidas do gado europeu, como habilidade materna, precocidade, fertilidade e qualidade de carne, fez com que os pesquisadores americanos iniciassem os cruzamentos no ano de 1912 na Estação Experimental do Departamento de Agricultura de Jeanerette, Lousiana. Neste mesmo período criadores de Oklahoma, Texas e até no Canadá, fizeram o mesmo (www.brangus.org.br).

Os dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial para 2001, mostram que as raças sintéticas de bovinos de corte que mais comercializam sêmen congelado de origem nacional são a Braford, com 61.277 doses, a Brangus com 54.436, a Santa Gertrudis com 33.465 e a Canchim com 24.892 (www.asbia.org.br). Os cruzamentos que deram origem a raça Brangus-Ibagé no Brasil, começaram a partir da década de 40. Em 1955 nasceram em Bagé, os primeiros animais de sangue 5/8 Aberdeen Angus + 3/8 Nelore. Os pioneiros da raça receberam o nome Ibagé, em função de um personagem indígena histórico no município (www.brangus.org.br). A criação da raça Braford no Brasil iniciou-se na década de 60, pelos cruzamentos das raças Hereford e do gado zebuíno (zebu americano e brasileiro), sendo reconhecida pelo Ministério da Agricultura do Brasil em 1993 (www.bovinos.npg.ig.com.br).

Com relação as raças sintéticas leiteiras, existem no Brasil a Girolando (Gir x Holandês); Pitangueiras (Guzerá x Red Polled); Guzolando (Guzerá x Holandês); Simbrasil

(Simental x Guzerá); Lavínia (Pardo Suíço x Guzerá) (www.bovinos.npg.ig.com.br). No entanto estes cruzamentos para produção leiteira somente têm sido comprovadamente vantajosos nos indivíduos F1 (Cunningham & Syrstad, 1987; Madalena et al. 1990), sendo que as perspectivas de outros cruzamentos ainda são questionáveis (McDowell et al. 1996).

Sistemas utilizando gado europeu puro especializado podem apresentar bom desempenho zootécnico e econômico em determinadas regiões tropicais, contudo os animais são mais exigentes em manejo, principalmente no que se refere à alimentação e sanidade. Os cruzamentos assumem grande importância na maioria dos sistemas de produção predominantes nas áreas tropicais (Teodoro & Verneque, 1999).

A heterose ou vigor híbrido é o fenômeno pelo qual os produtos de cruzamentos apresentam desempenhos superiores ao desempenho médio dos pais. É mais intensa quanto mais afastadas geneticamente forem as linhagens ou raças em relação a sua origem, como por exemplo entre raças européias e zebuínas, com o F1 apresentando maior heterozigose. Basicamente a heterose possibilita a produção de maior número de “enzimas”, garantindo ao híbrido maior versatilidade bioquímica possibilitando melhores ajustes aos seus mecanismos fisiológicos e de desenvolvimento às circunstâncias do ambiente (Falconer, 1981)

A composição de uma nova raça é o resultado de um trabalho de seleção tanto na raça formada como nas de origem. O número de animais na raça sintética deve ser grande o suficiente a fim de manter a variabilidade genética e os benefícios da heterose, bem como suportar economicamente uma exigente seleção por fertilidade. O componente fertilidade é o parâmetro que exerce maior influência sobre os lucros do criador (www.deltag.com.br).

A predição da fertilidade

A fertilidade pode ser definida como a capacidade de gerar filhos normais, o que é essencial para o progresso genético e a alta produtividade animal (Galloway, 1979). A determinação da capacidade reprodutiva e genética do touro, é influenciada pelo manejo, idade do reprodutor, aspectos relacionados a pastagens, deficiências nutricionais ou mesmo a problemas referentes às fêmeas, tais como reabsorção embrionária e alterações endometriais. Portanto, a única alternativa para se determinar o potencial reprodutivo real do touro, é através do exame de suas funções reprodutivas (Silva et al. 1993).

O exame andrológico é teoricamente um meio de detecção da fertilidade potencial dos touros. Este exame está padronizado no Brasil através das normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) ou ainda seguindo a classificação andrológica por pontos (CAP), voltada para atender as peculiaridades dos touros Zebus (Vale Filho et al., 1994; Vale filho et al. 1997; Salvador et al. 2002).

A validade do exame andrológico nos sistemas de produção foi demonstrada por Wiltbank & Parish (1986), através do incremento de 5% na fertilidade de rebanhos de vacas Santa Gertrudis e também por Coulter & Kozub (1989) em sistema extensivo. Pioneiramente, em 1934 na Suécia, Lagerlöf descreveu a evidência de uma relação entre a morfologia espermática e a fertilidade em touros. Uma vez estabelecida a importância dos defeitos espermáticos, Blom (1950) propôs um protocolo para avaliação da morfologia por defeitos primários e secundários, e novamente em 1973, reclassificou os defeitos em maiores e menores de acordo com a importância na fertilidade. Atualmente, levantamentos mostram que a morfologia espermática alterada ainda é um dos principais motivos de descarte de touros para reprodução (Gottschall & Mattos, 1997; Chacón, 2001; Fitzpatrick et al. 2002).

O exame andrológico primeiramente se realiza através de um exame clínico geral, onde se observa o estado nutricional (Van Demark & Manger, 1964; Wolf et al. 1965), a presença de problemas físicos que impossibilitem à reprodução, como alterações nos olhos, membros locomotores e coluna vertebral (Carroll et al. 1963; McGowan et al. 2002). A próxima etapa é o exame detalhado da genitália externa, onde são observadas importantes características reprodutivas, como a consistência testicular (Müller et al. 1992; Galloway, 1994; Chacón et al. 1999b), perímetro escrotal (Foote et al., 1970; Coulter et al., 1976; Madrid et al. 1988; Moser et al. 1996), e ainda alterações no pênis e prepúcio e genitália interna, sendo as alterações patológicas nas glândulas vesiculares as maiores causas de descarte de touros (Larson, 1980). Posteriormente os animais devem passar por uma análise do ejaculado, onde são medidas características como pH, volume e concentração do ejaculado; motilidade, vigor e morfologia espermática. Uma imensa quantidade de experimentos têm sido realizados nas últimas décadas a fim de avaliar a correlação destas características seminais com a fertilidade (Saack, 1970; Sullivan, 1970; Saack & White, 1972; Barth & Oko, 1989; Fitzpatrick et al. 2002; Fernandez & Garcia, 2002). Moraes

(1995) observou que os coeficientes de correlação não revelaram associação entre as características medidas no exame andrológico e a fertilidade do rebanho.

A libido é outra característica mensurável com um grande componente genético, e que apresenta um efeito positivo nas taxas de prenhez do rebanho. A avaliação comparativa e quantitativa desta característica requer o procedimento de testes formalmente chamados de teste de libido ou de capacidade de serviço. Alguns protocolos destes testes são mais direcionados para raças bovinas européias (Osborne et al. 1971; Blockey, 1976a; Chenoweth, 1997; Landaeta-Hernandez et al. 2001) e outros para as raças zebuínas (Piccinali et al. 1992; Pineda et al. 1997). As diferenças no tipo de avaliação se devem ao fato de que os touros Zebus, por exemplo, se apresentam mais lentos para reagir frente a uma fêmea em estro e apresentam reduzido número de montas quando comparados com os touros de origem européia, tanto as raças adaptadas a clima tropical como as de clima temperado (Chenoweth et al., 1996).

Através de observação contínua do comportamento de rebanhos bovinos se observou a existência de uma hierarquia social entre os animais (Blockey, 1976b; Orihuela et al. 1988; Rodriguez et al., 1993; Gutierrez et al., 1993; Fordyce et al., 2002). Em grupos heterogêneos onde se encontram animais de raças, idades e tamanhos distintos, observou-se por exemplo que determinados touros cortejam e montam as vacas em cio, impedindo que outros atuem. Estes estudos demonstram a relevância que a interação comportamental pode apresentar no desempenho reprodutivo dos animais.

A predição da fertilidade através do exame andrológico pode apresentar controvérsias quando comparada com os resultados a campo. Crudelli et al. (1992) não encontraram diferenças nas taxas de gestação das vacas expostas a touros classificados quanto a fertilidade potencial em aptos, inaptos e questionáveis, e Costa e Silva et al. (1993) também não encontraram diferenças nos touros classificados em bons, muito bons e excelentes. Alterações degenerativas testiculares transitórias, em função de fatores estressantes de origem climática, podem permitir que o diagnóstico reprodutivo dos touros seja alterado durante o período da estação de monta (Silva et al., 1991; Fonseca et al., 1992; Horn et al. 2002). Outra possibilidade que pode ocorrer é quanto ao número de vacas efetivamente ciclando no rebanho. Se este índice for baixo, as taxas de prenhez entre touros excelentes e regulares podem ser semelhantes (Molina et al. 2002).

Nenhum teste aplicado individualmente provou ser totalmente seguro na predição da fertilidade (Neville et al 1971; Fernandez & Garcia, 2002; McGowan et al., 2002). Esta dificuldade é expressada por Hammerstedt (1996) que salienta que identificar animais subfêrteis é possível; reiterar fertilidade para animais com histórico de boa fertilidade é uma possibilidade razoável; porém predizer a fertilidade dos machos é impossível. Higdon et al. (2000) ao aplicarem três tipos de protocolos de exame andrológico, em aproximadamente 2.900 touros, observaram que o percentual de animais considerados aptos à reprodução foi significativamente diferente em cada método de avaliação. Esta dialética foi previamente levantada por Amann (1995), e também Moraes et al. (1998) contribuem com a reflexão da necessidade de mudanças nos critérios atuais recomendados para análise reprodutiva de touros, visando reduzir perdas e evitar que animais zootecnicamente importantes sejam descartados por critérios muito exigentes ou inadequados a condição genotípica da população.

Fertilidade nos sintéticos

Considerando que as raças Européias são as mais antigas no processo de seleção imposta pelo homem, não é estranho se observar uma melhor performance reprodutiva para estes animais (Roncoleta, 1998). Ainda a identificação de diferenças entre raças sintéticas e puras em relação a performance reprodutiva, é esperada considerando a diversidade genética entre as duas subespécies de bovinos (Galina & Arthur, 1991; Chenoweth et al. 1996).

No sul do Brasil, foi observado que animais contemporâneos de idade, mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo, componentes das raças Hereford e Braford, ao serem avaliados durante três anos consecutivos, apresentaram índices médios de descarte ao exame andrológico de 18 e 47% respectivamente. Na raça Hereford o percentual de inaptos ao longo dos anos oscilou de 9 a 27% e nos touros Braford de 36 a 52% (Moraes et al. 1998). Na Austrália, em região subtropical, foi observado que a raça Brahman e suas cruzas apresentaram maiores taxas de hipoplasia testicular e também menor libido e taxa de concepção (Chenoweth & Osborne, 1975). Na Índia foi encontrado um percentual de 48% de descarte à reprodução em touros cruzas (Babu & Rao, 1991). Na Costa Rica, em clima tropical, foi constatado um maior percentual de descarte de touros de genótipos cruza

(48%) em relação ao puro europeu (41%) e zebu (29%) (Chacón, 1999a). Estes resultados indicam uma desvantagem dos genótipos cruzas em relação aos puros, no exame da fertilidade potencial, em diferentes climas e sistemas de produção. As perdas econômicas podem ser um fator limitante para a disseminação destas raças naqueles sistemas de produção onde existem condições ambientais favoráveis à máxima expressão genética.

A morfologia do cromossomo Y nos touros de raças sintéticas

As situações de baixa performance sexual observada nos machos oriundos de cruzamentos interespecíficos já foram motivo de estudos citogenéticos. O cromossomo Y encontrado no *Bos taurus taurus* é submetacêntrico e aparentemente equivalente a região terminal do braço longo do cromossomo Y acrocêntrico encontrado dos *Bos taurus indicus* (Pinheiro et al., 1980).

A diferença entre os cromossomos Y nas duas subespécies foi apontada como consequência de uma inversão pericêntrica no cromossomo Y (Kieffer & Cartwright, 1968) confirmada por Pinheiro et al. (1980) através do padrão de bandas G e C. As variantes do cromossomo Y foram estudadas em mais de 30 raças e relacionadas com a fertilidade por Halnan (1989), onde se levanta a hipótese que estes cromossomos poderiam servir como marcadores raciais e como um modelo genético para explicar as baixas taxas de natalidade nos touros derivados de cruzamento com Brahman. A baixa fertilidade nesses cruzamentos oriundos de animais onde coexistem os dois tipos morfológicos de cromossomo Y na população, poderia ser devida a pequenas deleções ou mudanças de posições entre a região de sinapse dos cromossomos X e Y, ou, mesmo, a alterações em genes cujos produtos participem da regulação da reprodução.

Evidências de irregularidades relativas ao pareamento e recombinação cromossômica durante a meiose na prole F1 ou retrocruzamentos, que concordam com a teoria de Haldane (1922), sobre a tendência do sexo heterogamético manifestar problemas de fertilidade, são encontrados em ratos (Hale et al. 1993; Kaku et al, 1995), *Drosófilas* (Lamnisou et al, 1996; Joly et al. 1997; Snook, 1998) e em bovídeos (Basur & Moon, 1967; McColl, 1990). Anomalias na fase de paquíteno incluem univalência, bivalência com cromossomos parcialmente pareados, desigualdade de comprimento dos cromossomos homólogos, pareamentos não homólogos, associações com seguimentos autossomais e

assinapses com cromossomo X. Machos estéreis e férteis de retrocruzamento apresentaram heterozigose na região pseudoautossomal, mas apesar das diferenças genéticas nas respectivas regiões pseudoautossômicas, o X e Y foram, no entanto, hábeis em realizar sinapses em mais de 50% dos núcleos paquítenos nos machos F1 (Hale et al. 1993).

Em humanos, é de consenso geral, baseado no cariótipo, que a inversão pericêntrica produz uma grande incidência de cromossomos com complementos desbalanceados. Este fato sugere que indivíduos portadores desta deficiência, tem uma grande probabilidade de carregar defeitos genéticos ocasionados pela perda ou duplicação de múltiplos genes (Halnan, 1989). Apesar de saber-se que as inversões interferem com a espermatogênese, o(s) gene(s) específico(s) ainda não foi identificado (Mak & Jarvi, 1996).

Controle da espermatogênese à nível genético, parácrino e imunológico

A formação do gameta masculino ocorre em fases sequenciais de mitose, meiose e pós-meiose, que incluem recombinação genética, expressão de gene haplóide, formação do acrossoma e flagelo, e remodelação e condensação da cromatina (Eddy, 2002). Wolgemuth et al. (2002) descrevem um sumário de genes que se expressam em determinados momentos do ciclo celular durante a gametogênese, e que geralmente estão divididos em uma das quatro classes: genes que são expressos tanto nas células germinativas como nas somáticas nas gônadas ou outros órgãos; genes que são muito mais abundantes na linhagem germinativa; genes aparentemente específicos da linhagem germinativa e finalmente genes que são específicos de uma ou outra linhagem germinativa, exibindo dimorfismo sexual em seu padrão de expressão.

Embora o FSH aumente a viabilidade do epitélio seminífero e a proliferação das espermatogônias (Foresta et al., 1998) e que os andrógenos sejam essenciais para diferenciação do trato reprodutivo masculino (Huang et al., 1987), eles não são suficientes para induzir o desenvolvimento normal da espermatogênese (Tsutsumi et al. 1996; Sairam & Krishnamrthy, 2001; Souza et al. 2002). O desenvolvimento da função testicular requer também uma produção de fatores locais e uma interação célula a célula que regula o crescimento e a diferenciação do tecido. Segundo Skinner (1991) estas interações estão classificadas em ambiental, nutricional e regulatória, que envolvem respectivamente o

ambiente extracelular afetando as células em contato, a liberação de nutrientes essenciais entre as células, e a transdução de sinais que regulam a função de outras células em um nível molecular.

Fatores locais envolvidos nas interações entre células de Sertoli, de Leydig e germinativas incluem *insulin growth factor 1* (IGF-1), inibina, *transforming growth factor* β (TGF- β), ocitocina, vasopressina, opióides e esteróides (Gnessi et al., 1997; Schlatt et al. 1997; Wagener et al. 2000). O epitélio seminífero, também é uma fonte de muitas citocinas, como Interleuquinas 1 e 6, e fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) (Khan et al. 1987; Syed et al. 1988; Khan et al. 1988; Syed et al. 1993). O papel das citocinas na função testicular têm sido examinado em condições normais e patológicas (Hales et al. 1999; Roser, 2001). Estas citocinas são produzidas pelas células de Sertoli, células germinativas, macrófagos e células de Leydig e atuam na modulação da espermatogênese (Dugast & Jegou, 1994; Cudicini et al. 1997; Stephan et al. 1997). Interleucina I é liberada em condição estágio-dependente e estimulada pela presença de corpos residuais de citoplasma das espermátides alongadas (Gerard et al. 1991). Os lipopolissacarídeos, componentes ativos de bactérias gram-negativas, também estimulam a liberação de interleucinas 1 e 6 pelas células de Sertoli (Syed et al. 1993).

Em algumas espécies, incluindo o homem, o número de macrófagos é particularmente substancial no testículo, representando o segundo tipo celular intersticial mais numeroso, depois das células de Leydig (El-Demiry et al. 1987). Macrófagos e vários subtipos de linfócitos são identificados nos testículos de carneiros e ratos (Pöllänen & Maddocks, 1988). Os macrófagos estão em íntima associação com as células de Leydig e atuam juntos na regulação da esteroidogênese (Gaytan et al. 1996; Meinhardt et al. 1998).

Considerando todas as interações existentes no testículo, conclui-se que a espermatogênese normal depende tanto da funcionalidade do eixo hipotalâmico-hipofisário como do controle local parácrino/autócrino. Com material testicular coletado por biópsia ou castração, é possível o isolamento, a caracterização e a mensuração destes fatores locais regulatórios da espermatogênese, em diferentes grupos raciais de bovinos.

Introdução aos estudos

O estudo das funções reprodutivas no touro, e o reconhecimento da sua importância na produtividade do rebanho teve início no século passado, e desde então têm sido aprimorado através dos avanços tecnológicos. Técnicas avançadas nos permitem um conhecimento mais aprofundado e dinâmico das causas e fatores que predis põe e contribuem para os problemas de subfertilidade e infertilidade bovina. O domínio de diversas áreas de estudo permite que a abordagem dos problemas tenha se tornado mais “fácil”, em termos, pois a cada dia é possível identificar um expressivo número de fatores que interagem para uma causa.

O problema que motivou este estudo foi o alto percentual de descarte de touros por alterações reprodutivas, precisamente qualidade de sêmen, que se apresenta em determinados sistemas produtivos nos quais estão inseridas as raças sintéticas. Em razão das diferenças existentes entre raças e ambientes, o sucesso do uso da raça sintética dependerá, dentre outras coisas, de se ter maior entendimento das relações existentes entre genótipo e ambiente para que se possa otimizar a produção. A forte seleção que deve ser feita nas raças em formação, também na aptidão reprodutiva, tem trazido prejuízos em alguns sistemas pecuários que realmente exercem esta premissa. A investigação da origem destas diferenças é a base deste estudo, que se depara com a complexidade do controle da espermatogênese, ainda com muitas perguntas sem resposta e muitos caminhos a serem abordados. Através de cinco experimentos foi permitido observar o comportamento da espermatogênese de touros de raças sintéticas do nível cromossômico ao funcional do epitélio seminífero.

As hipóteses formuladas para a solução do problema do maior percentual de touros das raças sintéticas sendo descartados por alterações na qualidade de sêmen, em comparação com os puros que deram origem a raça, foram:

1. A baixa qualidade seminal nos touros de raças sintéticas trata-se de uma condição permanente;
2. A baixa qualidade de sêmen é decorrente do tipo de cromossomo Y da subespécie formadora (*Bos taurus taurus* apresentam Y submetacêntrico e *Bos taurus indicus* apresentam Y acrocêntrico);

3. Os touros das raças sintéticas têm menor capacidade de seleção de espermatozoides anormais ao longo do epidídimo;

4. A baixa qualidade seminal dos touros de raça sintética, têm origem em algum dos estádios do ciclo espermatogênico.

5. A expressão de fatores de crescimento no epitélio seminífero, bem como a população de células de Sertoli, se apresentam de maneira distinta entre touros aptos e inaptos de raças sintéticas.

Os objetivos formulados na busca da solução do problema foram:

1- Analisar a variação da qualidade seminal, ao longo do tempo, em touros de genótipo puro e sintético, classificados como aptos e inaptos à reprodução

2- Identificar a relação entre o tipo morfológico do cromossomo Y e a condição reprodutiva dos touros de raças sintéticas e investigar o efeito do tipo de cruzamento

3- Investigar a seleção de células espermáticas anômalas durante a passagem pelo epidídimo, em touros oriundos de cruzamentos entre taurinos e zebuínos com e sem alteração na qualidade seminal

4-Avaliar qual a frequência dos túbulos seminíferos nos diferentes estádios do ciclo espermatogênico nos touros aptos e inaptos a reprodução

5-Observar a presença de $TGF\alpha$ (*Transforming growth factor α*) no epitélio seminífero de touros adultos, com qualidade seminal normal e alterada e identificar a frequência de células de Sertoli presentes nos túbulos seminíferos nos diferentes estádios, em touros aptos e inaptos à reprodução através do anticorpo S100.

Capítulo 2

Varição temporal na qualidade do sêmen de touros de genótipo puro europeu e sintético derivado

(Temporal variation in semen quality in purebred and derived crossbreed bulls)

Horn, M.M.¹; Moraes, J.C.F.²; Maciel, M.N.³

¹Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS; ²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS; ³Doutorando no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária/CCR-UFSM, Santa Maria, RS

Artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.26, n.4, 2002

Varição temporal na qualidade do sêmen de touros de genótipo puro europeu e sintético derivado

(Temporal variation in semen quality in purebred and derived crossbreed bulls)

Horn, M.M.¹; Moraes, J.C.F.²; Maciel, M.N.³

¹Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS; ²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS; ³Doutorando no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária/CCR-UFSM, Santa Maria, RS

e-mail para contato: ferrugem@cppsul.embrapa.br

RESUMO

Foram utilizados seis touros Hereford e seis touros Braford (5/8 Hereford + 3/8 Nelore), com idade oscilando entre 19 e 24 meses no período experimental (meses de março a agosto). Os touros foram classificados quanto a aptidão reprodutiva como aptos e inaptos e equitativamente distribuídos dentro de cada genótipo. Os indicadores de qualidade medidos no exame andrológico foram: motilidade espermática, defeitos espermáticos (cabeça, peça intermediária, cauda e acrossoma) e percentual de espermatozóides normais. As variáveis foram submetidas a análise de variância considerando os efeitos de raça, condição reprodutiva e mês de avaliação. A análise dos dados mostrou diferenças entre as médias mensais de motilidade, defeitos de cabeça e peça intermediária ($P < 0,05$). Foram detectadas diferenças para as variáveis: motilidade, percentual de células normais e defeitos de cabeça ($P < 0,05$), e os touros Hereford apresentaram as melhores médias. Exceto para os defeitos de acrossoma, todas as variáveis foram diferentes entre touros aptos e inaptos ($P < 0,05$). Considerando as modificações nas características seminais dos touros durante o experimento, é possível concluir que as alterações na qualidade seminal caracterizam um quadro degenerativo reversível. Porém, nos touros sintéticos inaptos não houve uma recuperação significativa da qualidade do sêmen, indicando alguma peculiaridade na gametogênese neste conjunto de indivíduos.

PALAVRAS CHAVE: qualidade do sêmen, bovinos, cruzamentos

SUMMARY

Six Hereford bulls and six Braford (5/8 Hereford + 3/8 Nelore) bulls were used, which were between 19 and 24 months old during the experimental period (between march and august). The bulls were classified according to their breeding soundness into sound and unsound within each genotype. The quality indicators determined for the andrologic examination were: sperm motility, sperm defects (head, mid-piece, tail and acrosome) and % normal sperm. The variables studied were subjected to analysis of variance considering the effects of breed, reproductive condition and month of evaluation. The analysis of the data revealed significant differences ($P<0.05$) between month for motility, and for head and mid-piece defects. Differences between breeds were detected for motility, percent normal cells, and head sperm defects ($P<0.05$). Except for acrosome defects, all the variables studied were significantly different between sound and unsound bulls. Considering the variations in the breeding soundness evaluation of the bulls during the experiment, it is possible to conclude that the modifications in the semen quality characterizes a reversible degenerative process. The lack of recuperation in semen quality in the synthetic breed unsound bulls studied is indicative of some peculiarity in the gametogenesis of this group of individuals.

KEY WORDS: semen quality, bovine, crossbreeds

INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm indicado que a degeneração testicular é uma das principais enfermidades da genitália masculina de touros, resultando em menor qualidade de sêmen (Amann, 1962; Vale Filho et al., 1986; Ohashi et al., 1988). Neste contexto, a qualidade do sêmen é uma característica que pode ser facilmente afetada por variações nas condições fisiológicas, como a idade (Gottschall & Mattos, 1997), condições ambientais adversas, ou mesmo variações sazonais (Galina & Arthur, 1991; Igboeli & Rakha, 1971; Fonseca et al., 1992; Chacón et al., 1999), notadamente, estas últimas, relacionadas a ocorrência de elevadas temperaturas e umidade do ar,

que podem deprimir as funções gonadais, com o diagnóstico de degeneração testicular, na maioria dos casos reversíveis e caracterizadas por variações na concentração espermática e percentagem de espermatozóides com defeitos morfológicos.

Existem evidências de qualidade de sêmen inferior em touros jovens de raças sintéticas, quando comparados a seus contemporâneos de genótipo puro europeu (Moraes et al., 1998). No entanto, não foram detectadas diferenças nesses grupos raciais, quando submetidos a degeneração testicular experimental com dexametasona (Horn et al., 1999a) e a um desafio individual empregando vacas com cio sincronizado (Horn et al., 1999b). A questão central enfocada neste experimento é se a baixa qualidade de sêmen nesses animais se trata de uma condição permanente ou reversível.

O objetivo deste estudo foi de analisar a variação da qualidade seminal de touros de genótipo puro e sintético, classificados como aptos e inaptos para a reprodução, em um período de seis meses.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 touros, seis da raça Hereford e seis da raça Braford, tendo em cada grupo racial três touros classificados quanto a aptidão reprodutiva em aptos e três em inaptos (MAARA- Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1996). Os animais, oriundos de uma propriedade particular, estiveram durante seis meses nas dependências da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, neste período suas idades variaram entre 19 e 24 meses. Estes animais durante o período experimental foram mantidos juntos em pequenos poteiros com pastagens naturais, compostas principalmente por *Paspalum sp.* e *Axonopus sp.*, suplementados com feno de pastagem natural. As coletas de sêmen foram realizadas durante os meses de março, maio, junho e agosto, totalizando 91 coletas de sêmen, sendo em média nove coletas por animal. Os touros foram submetidos a monta natural na proporção de 1 macho: 40 fêmeas durante um período de 6 dias durante os meses de maio e junho de maneira escalonada (ver Horn et. al., 1999b) As coletas e a avaliação do sêmen foram procedidas segundo descrito por Pimentel (2000). As amostras de sêmen foram colhidas por eletroejaculação e avaliadas em lâminas pré aquecidas, para estimativa

da motilidade espermática em aumento de 100x e 400x em termos de percentual de células com movimento progressivo. Na seqüência foram preparados esfregaços corados pela técnica de Cerovysk (1976), para avaliação da morfologia espermática em microscopia convencional (1000x). Foram observadas 200 células em cada avaliação. Os defeitos foram classificados em grupos: defeitos de cabeça (delgado na base, piriforme, subdesenvolvido, pequeno anormal e cabeça isolada anormal), de peça intermediária (desnuda, fibrilada, pseudo-gota, fratura, hipoplásica e gotas citoplasmáticas proximais e distais), de cauda (cauda dobrada e enrolada) e de acrossoma (contorno irregular, vacúolos e desprendimento). As variáveis foram transformadas em “ranks” e submetidas a análise de variância empregando o pacote NCSS 6.0 (Hintze, 1995), considerando os efeitos de raça, condição reprodutiva e mês de avaliação e as interações entre dois fatores. A comparação entre as médias foi efetivada pelo teste de Duncan.

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentadas as médias mensais para as características seminais avaliadas. As médias obtidas mostram diferenças significativas ($P < 0,05$) para a motilidade espermática, defeitos de cabeça e peça intermediária.

Tabela 1. Médias ajustadas das características seminais de touros da raça Hereford e sintéticos Braford durante um período de seis meses.

Características Sêmen	Março N= 12	Maió N= 11	Junho N= 12	Agosto N= 56
Motilidade	40,5 ± 3,5 ^a	33,2 ± 3,7 ^a	31,9 ± 3,5 ^a	56,9 ± 1,6 ^b
Defeitos de cabeça	8,3 ± 2,2 ^a	10,1 ± 2,2 ^{ab}	16,2 ± 2,2 ^b	13,4 ± 1,0 ^{ab}
Peça intermediária	1,7 ± 1,7 ^a	0,6 ± 1,7 ^a	2,5 ± 1,7 ^a	9,0 ± 0,8 ^b
Defeitos de cauda	8,3 ± 1,8 ^a	5,0 ± 1,9 ^a	7,2 ± 1,8 ^a	8,4 ± 0,9 ^a
Acrossoma	3,2 ± 0,3 ^a	10,4 ± 2,4 ^a	9,2 ± 2,3 ^a	9,0 ± 1,0 ^a
Células normais	68,5 ± 3,9 ^a	62,6 ± 4,1 ^a	60,4 ± 3,9 ^a	60,2 ± 1,8 ^a

N, indica o número de coletas de sêmen efetivadas em cada mês; Letras diferentes na mesma linha indicam médias diferentes ($P < 0,05$); médias ± e.p.m.

Na Figura 1 são apresentadas as médias da motilidade espermática e dos percentuais de defeitos de cabeça e de células normais nos ejaculados de touros aptos e inaptos entre os meses de março a agosto, cuja interação foi constatada como significativa ($P < 0,05$). A interação entre raça e meses de avaliação não foi significativa para nenhuma das variáveis medidas. No entanto,

na Figura 2 está ilustrada a variação do percentual de células normais no ejaculado de cada touro avaliado ao longo dos meses. Nessa figura pode ser constatada uma estimativa qualitativa da espermatogênese de cada animal nas duas raças, se verifica que os touros sintéticos inaptos se posicionam sempre abaixo do limite mínimo de células normais, recomendados pelo sistema de normatização brasileiro, em contraste com os touros europeus puros.

Na Tabela 2 são apresentadas as médias de touros aptos e inaptos observadas nos dois conjuntos raciais. As diferenças ($P < 0,05$) entre raças e condição reprodutiva ocorreram para as variáveis: motilidade, defeitos de cabeça, cauda e percentual de células normais no ejaculado.

Tabela 2. Médias das características seminais medidas nos dois conjuntos raciais.

Características seminais	Braford		Hereford	
	Aptos N= 26	Inaptos N=22	Aptos N=23	Inaptos N=20
Motilidade	54,8±2,4 ^a	16,0±2,6 ^b	54,8±2,6 ^a	36,9±2,7 ^c
Defeitos de cabeça	5,7±1,5 ^a	26,2±1,6 ^b	3,8±1,6 ^a	12,3±1,6 ^c
Peça intermediária	1,5±1,1	5,5±1,3	1,9±1,3	5,0±1,2
Defeitos de cauda	2,4±1,3 ^a	14,4±1,7 ^b	2,2±1,3 ^a	9,9±1,3 ^c
Acrossoma	8,1±1,6	10,0±1,7	5,6±1,7	8,1±1,7
Células normais	78,4±2,7 ^a	33,3±2,9 ^b	83,9±2,9 ^a	56,1±2,9 ^c

N, indica o número de coletas de sêmen efetivadas em cada mês; Letras diferentes na mesma linha indicam médias diferentes ($P < 0,05$); médias \pm e.p.m.

A tendência geral foi de que os touros inaptos de ambas as raças apresentassem indicadores inferiores da qualidade do sêmen, ou seja, motilidade espermática e percentual de células espermáticas normais inferiores. Adicionalmente, foi observado que os touros inaptos da raça sintética apresentaram também, tendência semelhante quando contrastados contra os touros Hereford inaptos.

DISCUSSÃO

Foram observadas variações nas características do sêmen durante os seis meses de avaliação para motilidade espermática e defeitos de cabeça e peça intermediária, indicando a possibilidade de efeito ambiental sobre todos os animais (Tabela 1). As alterações na qualidade do sêmen podem ser decorrentes da escassez qualitativa e quantitativa de forragem (Galina & Arthur, 1991), o que ocorre nos meses de inverno na região Sul do Rio Grande do Sul. Isto, considerando, que entre os meses de Junho e Agosto a capacidade de produção dos campos naturais na região

se encontram em torno de apenas 300 kg de matéria seca por mês com uma digestibilidade “in vitro” na ordem de 30%, contrastando, respectivamente com 850 kg MS/mês e 50% de digestibilidade nos meses de outubro a dezembro (Salomoni & Silveira, 1996).

O percentual médio de células normais no ejaculado não foi diferente ao longo dos meses de avaliação, provavelmente devido a composição dos grupos, que incluíram animais com baixo e alto percentual de células normais (aptos e inaptos). Esses resultados não são surpreendentes, uma vez que levantamentos sobre a qualidade do sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial, têm evidenciado que nem a temperatura e a umidade do ar na região Sudeste do Brasil afetaram a produção espermática, porém, constando maior concentração espermática em touros *Bos indicus* e menor incidência de defeitos espermáticos em *Bos taurus* (Brito et al., 2002); e, que as percentagens de ejaculados descartados por taurinos e zebuínos são semelhantes, devidas a insuficientes motilidade e vigor espermático pré e pós-congelação (Anchieta et al., 2001). Em contraste, na Suécia, Soderquist et al. (1996), constataram variação estacional na qualidade espermática de touros de aptidão leiteira, caracterizada por maior freqüência de espermas anômalos nas estações mais quentes do ano.

No presente estudo, incluindo indivíduos normais e com espermatogênese alterada, a interação significativa entre condição reprodutiva e mês da avaliação (Figura 1), evidenciou nos touros inaptos aumento na motilidade espermática e redução no percentual de defeitos de cabeça durante o mês de agosto, contrastando com os touros classificados como aptos que apenas apresentaram redução na motilidade espermática nos meses de maio e junho, quando estavam trabalhando em monta natural na proporção de 1 macho para 40 fêmeas durante seis dias (Horn et al., 1999b). Esses fatos reiteram o comportamento diferencial entre os animais classificados como aptos e inaptos no período de estudo, associado também a atividade sexual e a reversibilidade do provável quadro de degeneração testicular nos touros inaptos.

As diferenças entre raças descritas na Tabela 2, demonstraram na maioria dos casos, médias desvantajosas para o genótipo sintético. No entanto, o pequeno número de animais não permite inferências diretas de que os touros de raça sintética apresentem menor qualidade seminal que os puros, porém, estes dados reiteram estudos anteriores (Moraes et al. 1998; Chacón et. al,

1999). Exceção feita ao percentual de defeitos de acrossoma, as demais variáveis medidas foram diferentes entre aptos e inaptos ($P < 0,05$), sendo este um resultado previsível, uma vez que o espermiograma, empregado para classificar os touros, foi o estimador da função gonadal. Porém, um aspecto importante que se verificou nesse estudo da morfologia espermática, é que não houve a predominância de nenhum tipo de defeito, nas duas categorias de animais, permitindo inferir que as diferenças na qualidade de sêmen dos touros esteja associada a um quadro de degeneração testicular (Amann, 1962).

A interação entre genótipo e mês, não foi significativa para nenhuma das variáveis analisadas ($P > 0,05$), as duas prováveis explicações para este fato poderiam estar relacionadas ao pequeno número de animais, e ainda, a composição de cada grupo com as duas classes de condição reprodutiva (apto e inapto), incluindo assim uma ampla variação das médias analisadas dentro de cada grupo genético.

Uma vez que a interação genótipo e mês não foi significativa para as variáveis testadas, os touros foram avaliados individualmente, dentro de cada grupo genético, quanto ao percentual mensal de células normais no ejaculado (Figura 2). Nesta análise foi considerado um mínimo de 70% de células normais no ejaculado para um touro ser considerado apto (MAARA- Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1996). Nesta figura pode ser visto que os touros classificados como aptos, apresentam de um modo geral uma tendência a redução do percentual de células espermáticas normais. Em contraste, nos Hereford inaptos, se observa que pelo menos dois indivíduos, mudam de classificação nos meses de março e agosto. No conjunto racial derivado de cruzamento, se observa que os inaptos, nunca atingem o limiar para mudança de classe. Estes resultados, a despeito de terem sido observados em um pequeno número de touros, confirmam que a observação de baixa percentagem de espermatozóides normais, tomada como um indicador da aptidão reprodutiva, não é uma condição permanente no caso dos touros de raças puras. Já para os touros sintéticos, efetivamente, não foi detectada uma melhoria do quadro espermático dos touros inaptos no período investigado.

Com base nos presentes resultados é possível concluir que a deficiente qualidade seminal nos touros de genótipo puro europeu é característica de um quadro degenerativo reversível, já os

touros sintéticos não apresentam um padrão de recuperação no quadro espermático semelhante ao observado nos touros puros, o que pode ser um indicativo de peculiaridade na gametogênese dos touros de raças sintéticas que deve ser melhor investigada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelas facilidades e animais, ao programa MCT-PRONEX pelo suporte financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela concessão da bolsa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **The American Journal of Anatomy**, v.110, p.69-78, 1962.
- ANCHIETA, M.C.; VALE FILHO, V.R.; QUIRINO, C.R.; ANDRADE, V.J.; SALVADOR D.F.; CADENA, R.A.; BATISTA, C.G. Descarte de ejaculados pré- e pós-congelação e doses de sêmen produzidas por touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, usados como doadores de sêmen em central de inseminação artificial, no Brasil centro sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 387-389, 2001.
- BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGÓN, 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, p. 181-190, 2002.
- CEROVSKY, J. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p.361-362, 1976.
- CHACÓN, J.C. MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, p. 221-231, 1999.
- FONSECA, V.O.; CRUDELI, G.A.; COSTA E SILVA, E.V.; HERMANNY, A. Aptidão reprodutiva de touros da raça nelore. efeito das diferentes estações do ano sobre as características seminais circunferência escrotal e fertilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.1, p.7-15, 1992.
- GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review of cattle reproduction in the tropics . Part 6. The Male. **Animal Breeding Abstracts**, v.59, n.5, p.403-412, 1991.
- GOTTSCHALL, C.S.; MATTOS, R.C. Achados de exames andrológicos em touros de corte *Bos taurus* e *Bos indicus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.4, p.25-28, 1997.
- HINTZE, J.L. **NCSS 6.0.2 User's Manual**. Kaysville, Utah, p. 1558, 1995.
- HORN, M. M.; MORAES, J.C.F.; GALINA C.S. Semen quality in purebred and crossbred beef bulls after six days of natural mating to synchronised females. **Ciências Veterinárias**, v.22, n.1, p. 61 - 70, 1999b.
- HORN, M.M., MORAES, J.C.F.; GALINA, C.S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé frente á degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p.523-526, 1999a.
- IGBOELI, G.; RAKHA, A.M. Season changes in the ejaculate characteristics of Angoni (short horn zebu) bulls. **Journal of Animal Science**, v.33, n.3, p.651-654, 1971.

- MAARA- Ministério da Agricultura e Abastecimento. (1996). Normas para sêmen e Centrais. Portarias n. 25 e 26 de 05 de setembro de 1996. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, n.174, 06 de set. de 1996.
- MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO, A. Avaliação andrológica em touros: Qualidade dos Indicadores da Aptidão reprodutiva em Distintos Grupos Raciais. **Ciência Rural**, v.28, p. 647-652, 1998.
- OHASHI, O.M.; SOUSA, J.S.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e Mestiços, criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.8, n.1/2, p.31-35, 1988.
- PIMENTEL, C.A. EXAME ANDROLÓGICO. In: C. S. GALINA, C.A. PIMENTEL, J.P. NEVES, J.C.F. MORAES, L.E. HENKES, P.B.D. GONÇALVES, T. WEIMER (editores). AVANÇOS NA REPRODUÇÃO BOVINA, Editora Universitária, Pelotas, p. 49-77, 2000.
- SALOMONI, E; SILVEIRA, C.L.M. Acasalamento de outono em bovinos de corte: abrace essa idéia. Livraria e Editora Agropecuária Ltda, Guaíba. 152 p., 1996.
- SODERQUIST, L.; JANSON, L. HAARD, M.; EINARSSON, S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I. bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 91-98, 1996.
- VALE FILHO, V.R.; PINHEIRO, L.E.L.; BASRUR, P.K. REPRODUCTION IN ZEBU CATTLE. In: D.A. MORROW (EDITOR), CURRENT THERAPY IN THERIOGENOLOGY, LOS ALTOS, USA, , 2. W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 437-442, 1986.

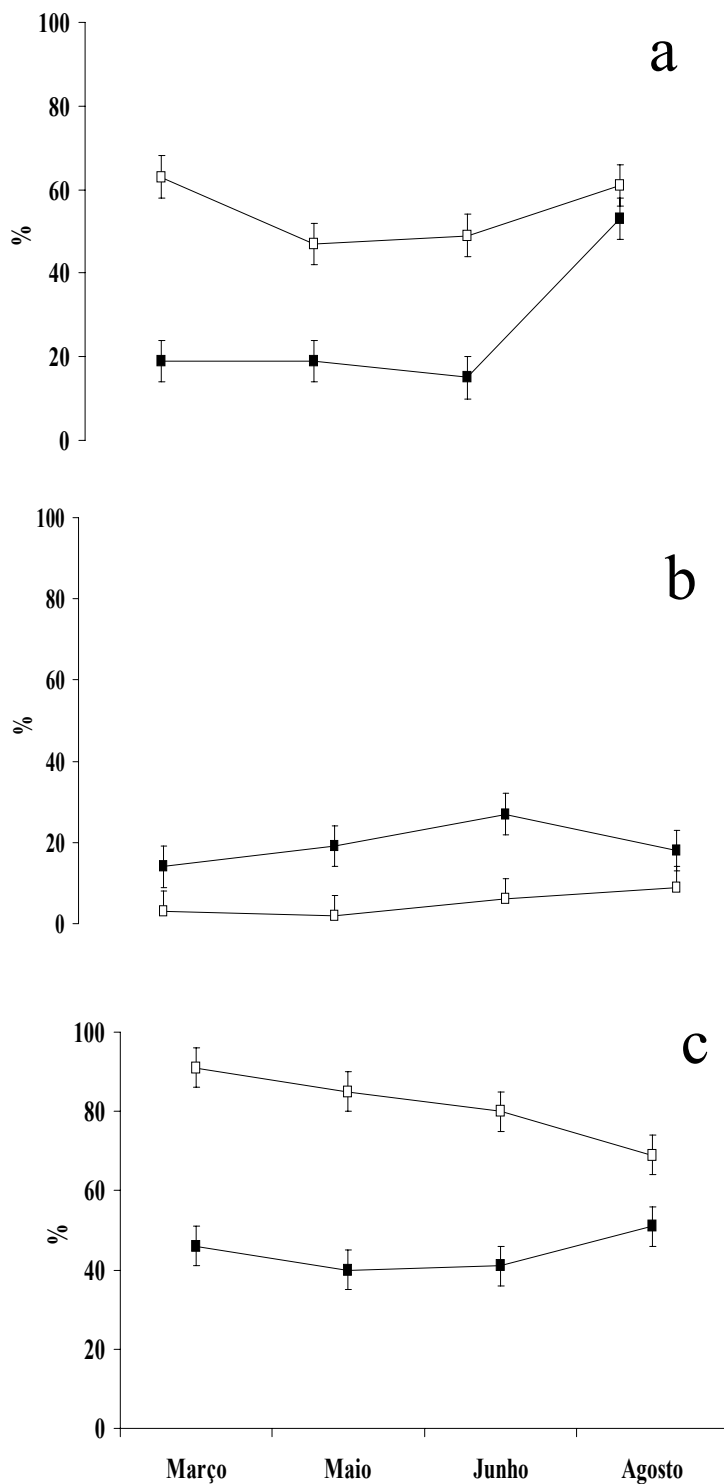
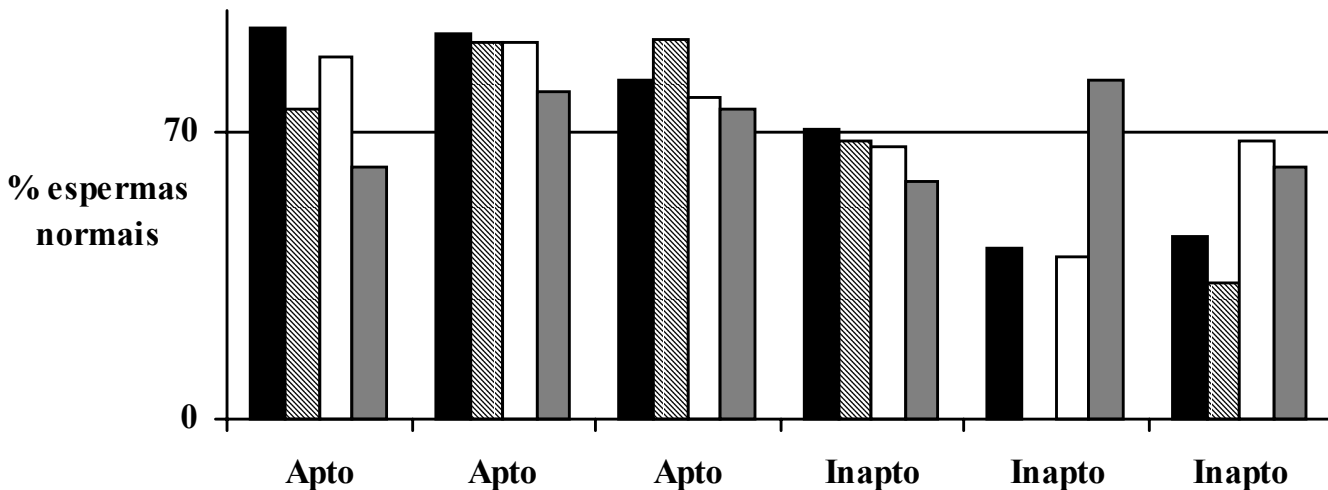


Figura 1. Motilidade espermática (a), percentual de defeitos de cabeça dos espermatozoides (b) e percentual de espermatozoides normais (c) em touros aptos (quadros brancos) e inaptos (quadros negros) nos meses avaliados.

Touros Hereford



Touros Braford

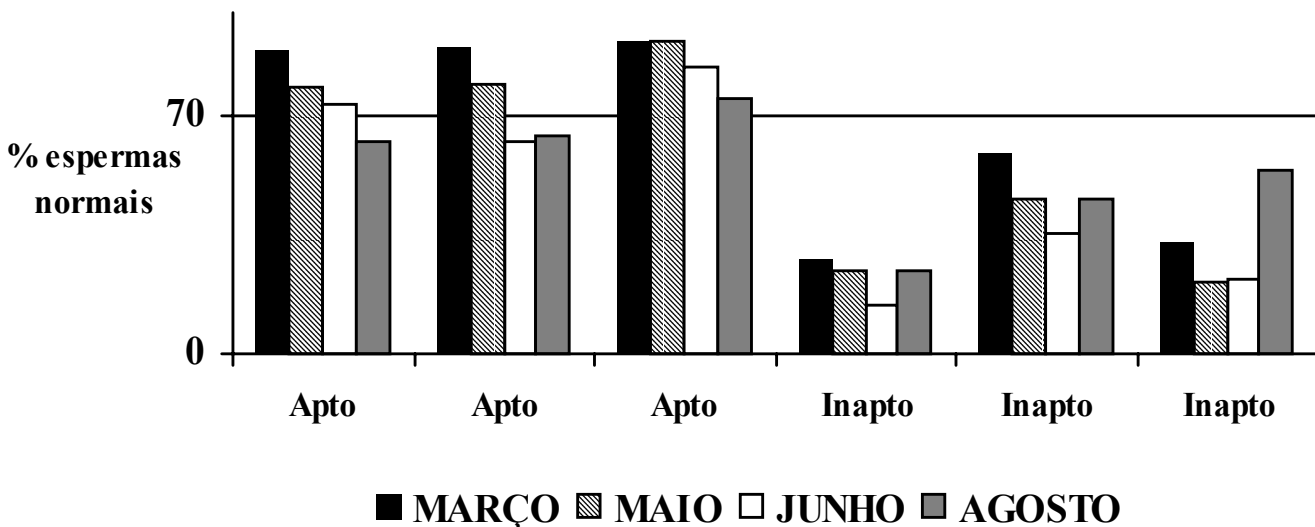


Figura 2. Variação individual no percentual de espermatozoides normais nos touros avaliados no período experimental.

Capítulo 3

The reproductive deficiency of bulls of synthetic breeds according to the morphology of the Y chromosome and the type of cross-breeding

Horn, M.M.¹; Moraes, J.C.F.²; Rosado, A.³; Edelweiss, M.I.⁴

Post-Graduate Student in Veterinary Science, Veterinary Faculty, UFRGS, Porto Alegre,

RS; ²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS; ³ Autonomous Veterinarian Practitioner; ⁴

Department of Pathology, UFRGS, Porto Alegre, RS

Submetido à revista Livestock Production Science

The reproductive deficiency of bulls of synthetic breeds according to the morphology of the Y chromosome and the type of cross-breeding

Horn, M.M.¹; Moraes, J.C.F. ²; Rosado, A. ³ ; Edelweiss, M.I.⁴

¹Post-Graduate Student in Veterinary Science, Veterinary Faculty, UFRGS, Porto Alegre, RS; ²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS; ³ Autonomous Veterinarian Practitioner; ⁴ Department of Pathology, UFRGS, Porto Alegre, RS

e-mail for contact: ferrugem@cppsul.embrapa.br

Abstract

The association between the morphology of the Y chromosome, either acrocentric or sub-metacentric, and reproductive soundness was evaluated through andrological examination, of 572 Braford and 220 Brangus-Ibagé bulls. The morphology of the Y chromosome in these breeds was studied through karyotype and breeding record analysis. No direct association was detected between the individual type of Y chromosome and reproductive soundness, previously estimated through an andrological examination. Also no direct involvement was detected from the paternal or maternal genotype with the reproductive soundness of the bulls. Another possibility analyzed was the different types of breeding strategies used to form the synthetic breeds. No differences were detected when all the breeding strategies used in the formation of the Braford and Brangus -Ibagé breeds were considered. However, in the Braford breed, in the breeding strategy that results in 3/8 Nelore animals, when 1/4 Nelore animals are used to produce 3/8 bulls, there is a greater percentage of culled bulls due to reproductive problems. The results of this study revealed that certain interactions between genotypes can be detrimental to the reproductive efficiency of 3/8 Nelore animals, and that breeding strategies avoiding, or favoring the breeding of certain types of genotypes can be used to reduce the percentage of bulls from synthetic breeds that are culled due to problems with semen quality.

Introduction

The Asiatic zebu cattle (*Bos taurus indicus*) and the European taurine cattle (*Bos taurus taurus*) in spite of being originated from the same ancestral base exhibit several differences in morphologic and physiologic characteristics (Wurster & Benirschke, 1968). Cytogenetic studies have shown that the

karyotypes of the two bovine sub-species (*Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*) are similar, presenting 58 acrocentric autosomes and two sexual chromosomes, where the X chromosome is submetacentric and the Y chromosome can vary with the sub-species (Kieffer & Cartwright, 1968). The Y chromosome found in *Bos taurus taurus* is submetacentric with the short arm apparently equivalent to the long arm of the Y acrocentric chromosome found in *Bos taurus indicus*. These two types of Y chromosome were found in bulls of the synthetic Brangus-Ibagé breed in Brazil (Pinheiro et al., 1979) and in “Pé Duro” bulls, an ancient European breed, indicating miscegenation between the two subspecies (Britto & Mello, 1999). The difference between the Y chromosome in the two sub-species was the consequence of a pericentric inversion in the Y chromosome (Kieffer & Cartwright, 1968). This finding was later confirmed by Pinheiro et al. (1980) judged by the pattern of the G and C bands. The variants of the Y chromosome was studied and related to fertility in more than 30 breeds (Halnan, 1989). In this study the author suggests that Y chromosome could be used as racial marker and as a genetic model to explain the low reproductive rate of bulls derived from Brahman crosses. The lower fertility in these crosses could be due to small deletions or position changes between the synapse region of the X and Y chromosomes, or to alterations in genes participating in the regulation of reproduction.

The breeding strategies used to obtain synthetic breeds offers an ideal model to study a possible association between the morphology of the Y chromosome and fertility, since both types of Y chromosome coexist in the same racial group. The hypothesis tested was direct towards the greater incidence of alterations in the spermatogenesis of crossbred males is due to gene modifications resulting from the rearrangement caused by the morphologic variation in the Y chromosome, which in turn could lead to gene product alterations. This could be due to the fact that both types of Y chromosome are introduced in different genotypes for the formation of the synthetic breed.

The objectives of the present study were to identify the relationship between the morphological type of the Y chromosome and the reproductive condition of the bulls in synthetic breeds, as well as to investigate the effect of the type of crossbreeding.

Material and Methods

The karyotypes were studied from lymphocyte cultures of Braford (76) and Brangus-Ibagé (21) bulls, to identify the morphological type of the Y chromosome (acrocentric or submetacentric). Also the type of the Y chromosome was investigated in 496 Braford and 199 Brangus-Ibagé bulls, through genealogic analysis, where the paternal genotype was identified.

The bulls used in this study were previously evaluated for reproductive soundness according to the specifications of the Brazilian Society for Animal Reproduction (MAARA- Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1996), recommending at the most 30% of sperm abnormalities motility >50% and vigour ≥ 3 were considered sound for breeding. Animals that did not conform to these criteria were considered reproductively unsound. The bulls were raised for sires in two private properties and to Embrapa Pecuária Sul, localized in the South of Brazil (Rio Grande do Sul State), in native pastures, mainly composed by *Paspalum* sp. and *Axonopus* sp, and winter cultivated pastures of *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus* and *Lolium multiflorum* up to breeding soundness evaluation for sale at two years of age.

Blood samples were collected from the tail vein in heparinized syringes after cleaning and disinfecting the area with 70% alcohol from the 97 karyotyped bulls. Blood samples were transported to the laboratory within 24 hours at a temperature between 5 and 10°C. Four drops of blood were placed in 10 ml of medium containing phytohemagglutinin for lymphocyte culture during 72 hours (Cultilab). The culture was gently shaken for a few seconds every 12 hours. Two hours before the end of the incubation period 50 μ l of a 0,025% (w/v) solution of colchicine was added to the culture medium. After the culture period the medium was centrifuged at 1000 r.p.m. for 5 min. The supernatant was separated and 4 ml of 0,075 molar potassium chloride was added for 15 min. After this time of hypotonicity, the cells were fixed with 4 ml Carnoy (3 parts methanol:1 part acetic acid) for 24 hours, when samples were centrifuged and washed three times with the same volume of Carnoy. A few drops of the material were placed on cold microscope slides, flamed and stained with Giemsa. Five metaphases from each animal were examined under the microscope at 1000 x magnification to determine the morphological type of the Y chromosome.

The other approach used to identify the type of Y chromosome was through genealogical studies. The results obtained were compared with those from the karyotypes. Genealogical data from three years (1998 - 2000) were used for Braford bulls and from eight years (1992 - 2000) for the Brangus-Ibagé bulls.

Table 1 presents the different types of mating used to obtain the animals with different degrees of crossbreeding established in the formation of the synthetic breeds.

The analysis of the association between the reproductive condition (sound or unsound) of the bulls and the morphological type of the Y chromosome and also the type of mating (Table 1) was carried out by Chi-square analysis. The correction of Yates was applied whenever the comparisons involved less than 100 animals, using the "PEPI Computer Programs for Epidemiologic Analysis", version 2.07^a, 1997.

Results

Of the sample of 97 bulls (76 Braford and 21 Brangus-Ibagé) used in the karyological study, 55 (57%) were diagnosed as sound and 42 (43%) were considered unsound for reproduction. Within the Braford genotype 50% of the sampled animals were reproductively sound. For the Braford group the percentage of sound and unsound bulls with the two types of Y chromosome morphology were similar ($\chi^2=1,053$; 1 GL; $P=0,305$), being 55 (72%) acrocentric and 21 (28%) submetacentric. Also, in the small sample of Brangus-Ibagé bulls, no significant difference was detected in Y chromosome morphology between the reproductive soundness classes ($\chi^2=0,032$; 1 GL; $P=0,859$), being 15 (71%) acrocentric and 6 (29%) submetacentric. Considering that no difference was detected in both breeds, all data were pooled, which included 42 (43%) sound and 28 (30%) unsound bulls with an acrocentric Y chromosome and 13 (13%) sound and 14(14%) unsound bulls carrying the submetacentric Y, on these grounds no association was detected between morphology of the Y chromosome and reproductive soundness ($\chi^2=0,684$; 1 GL; $P=0,408$).

The karyological results reveal that the employment of a genealogical analysis for Y chromosome morphology was useful, except for 6 ¼ bulls. In 496 Braford bulls, 160 (32%) and 69 (14%) carrying the acrocentric chromosome were respectively sound and unsound, of the bulls with a submetacentric Y chromosome 179 (36%) and 88 (18%) were respectively sound and unsound, no statistically significant differences were detected ($\chi^2=0,456$; 1 GL; $P=0,500$). The same tendency also not statistically significant was observed for the 199 Brangus-Ibagé bulls examined , which included 34 (17%) sound and 9 (5%) unsound

bulls with an acrocentric Y chromosome and 130 (65%) sound and 26(13%) unsound bulls carrying the submetacentric Y ($\chi^2=0,423$; 1 GL; $P=0,516$). For the total sample of 695 bulls no association between morphology of the Y chromosome and reproductive soundness could be detected ($\chi^2=0,247$; 1 GL; $P=0,619$).

Considering the type of mating, of the 496 Braford bulls, 50 were 1/2 Hereford + 1/2 Nelore having a acrocentric Y chromosome, due to the type of crossbreeding carried out in the south of the country, where Nelore bulls are used with Hereford cows. In this group of animals 31 (62%) were reproductively sound and 19 (38 %) unsound for reproduction. In 140 1/4 Nelore + 3/4 Hereford bulls the two types of Y chromosome morphology coexisted due to the type of mating carried out. In this group of animals also, no association was observed between the type of Y chromosome and reproductive soundness ($\chi^2=1,644$; 1 GL; $P=0,200$). The same was observed for 302 3/8 Nelore + 5/8 Hereford bulls ($\chi^2=0,255$; 1 GL; $P=0,613$).

Taken into account the parental genotype (Table 2) no significant differences were detected ($\chi^2=9,490$; 6 GL; $P=0,148$) between the reproductive soundness of bulls according to the genotype of the parents and Y chromosome morphology in the Braford breed, not considering the mating type 4 due to small number of animals samples. The same was observed for the Brangus-Ibagé bulls ($\chi^2=0,046$; 1 GL; $P=0,8361$).

In Table 2, the types of parental mating and the frequencies of sound and unsound bulls in both synthetic breeds are presented. Within the Braford breed, six classes were formed according to the genotype of the sire, to investigate any association with the reproductive soundness of the bull (types of mating in Table 1): Zebu male (Type1), European male (Type 2 and 4) 1/2 bred male (Type 3 and 6), 3/4 bred male (Type 5), 1/4 bred male (Type 7) and 3/8 bred male (Type 8). No statistically significant association was detected ($\chi^2=5,114$; 5 GL; $P=0,402$). The classes formed to investigate the effects of the maternal genotype were: Hereford female (Type 1, 3 and 5), 1/2 bred female (Type 2 and 7), 1/4 bred female (Type 6) and 3/8 bred female (Type 8), no significant association was detected between the genotype of the mother and the reproductive soundness of the bull ($\chi^2=4,313$; 3 GL; $P=0,230$).

In the 3/8 Nelore + 5/8 Hereford animals, deriving from mating types from 5 to 8, the data presented in Table 2 shows a tendency that the bulls originated from the mating type 5 (Hereford dam) present a greater percentage of bulls reproductively sound, and that those originating from the mating type 6 (1/4 bred dam) showed the lowest percentage of reproductively sound bulls ($\chi^2=6,675$; 3 GL; $P=0,083$). When the synthetic

bulls 3/8 bred Nelore, deriving from type of mating 8, were not included in the analysis, in the bulls originated from mating types 5, 6 and 7 a statistically significant difference was observed ($\chi^2=6,449$; 2 GL; $P=0,040$), indicating the advantage of using mating types 5 and 7 to produce bulls reproductively sound of synthetic breeds.

Discussion

The strategies used to obtain bulls of synthetic breeds (Table 1) provide an ideal model to study the two types of Y chromosome morphology in the same population. In general, the results of the analysis carried out showed that there was no significant direct association between the frequency of reproductively sound bulls and Y chromosome morphology, evaluated through karyotype and genealogical analysis, in both racial groups. The cytogenetic analysis did not agree with the genealogical data in 6 out of 76 animals. This discrepancy in 7.8% of animals occurred only in the 1/4 Nelore bulls, which originated from the multiple sire mating system used to produce this cross.

The culling rate of the Braford bulls (32%) is 10-20% above the normal culling rate described in the literature for purebred breeds (Johnson et al. 1995; Bruner et al. 1995; Gottschall & Mattos 1997; Ribeiro Filho et al. 1997). This high culling rate for breeding soundness observed in the Braford bulls is in agreement with reports that including bulls of synthetic breeds in other studies (Chenoweth et al. 1996, Moraes et al. 1998, Chacón et al. 1999). In contrast, the culling rate for reproductive soundness in the Brangus-Ibagé was only 18%. The percentage of 1/2 bred unsound bulls with an acrocentric Y chromosome was 38%, (Table 2) which is in agreement with what was observed for the whole Braford sample studied. Similarly for the 1/4 Nelore and 3/8 Nelore no evidence of a significant association was observed. The lack of association between the type of Y chromosome morphology and reproductive soundness suggests that the hypothesis that there is a direct effect of chromosomal rearrangement on fertility, must be rejected. However, the significant difference observed in the proportion of reproductively sound bulls in the mating types 5, 6, and 7 which result in 3/8 Nelore animals (Table 2), motivated another approaches to study the interactions between the different genomes and the Y chromosome.

A simultaneous analysis of Tables 1 and 2, shows through the frequency of bulls with semen problems, when individuals 1/4 Nelore were used as parents, the offspring had greater culling rate. In the

mating type 6, 1/4 Nelore females are used, and in mating type 7, 1/4 Nelore males are used. A possible explanation for the intermediate frequency of culling rate in this last mating type, could be that the 1/4 Nelore males originate from both 1/2 Nelore with an acrocentric Y chromosome, and Hereford bulls with a submetacentric Y chromosome, as one can see in Table 1 on mating types 2 and 3. Therefore, the mayor percentile of sperm abnormalities found in some types of crosses that lead to the formation of synthetic breeds, could be due to the presence of an acrocentric Y chromosome and the absence of the European genotype. Another observation corroborating this hypothesis is the fact that in the Brangus-Ibagé breed the mating type 6 was not used, and possibly that is why the culling rate for reproductive soundness in bulls of this breed are within the limits of what is considered normal.

Further research is needed to confirm this hypothesis, however, considering the economic losses involved with the high culling rates observed in some synthetic breeds due to reproductive unsoundness in bulls, it is well worthwhile to recommend not to use 1/4 zebu females, or 1/4 zebu males originated from *Bos indicus* parents, to produce 3/8 zebu (Nelore) bulls.

Acknowledgements

The authors are gratefull to Prof. Thales Renato de Freitas for technical assistance in preparing the karyotypes, to Dr. Nei Macedo for breeding soundness evaluation support, to Dr. Carlos Jaime and Dr. Carlos Galina for helpful suggestions, to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq for a post-graduate scholarship to the first author and to the MCT-PRONEX program, for financial support.

References

- Britto, C.M.C., Mello, M.L., 1999. Morphological dimorphism in the Y chromosome of “Pé Duro” cattle in the Brazilian state of Piauí. *Genet. Mol. Biol.*, 22, 369-373.
- Bruner, K. A., McCraw, R.L., Whitacre, M.D., Van-Camp, S.D., 1995. Breeding soundness examination of 1,952 yearling beef bulls in North Carolina. *Theriogenology*, 44, 129-145.

- Chacón, J., Pérez, E., Müller,, Söderquist, L., Rodríguez-Martinez, E., 1999. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. *Theriogenology*, 52, 221-231.
- Chenoweth, P.J.; Chase JR, C.C; Larsen, R.E.; Thatcher, M.J.D.; Bivens, J.F.; Wilcox, C.J. , 1996. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. *Applied Anim, Behav. Sci.*, 48, 225-236.
- Gotschall, G.S., Mattos, R.C. , 1997. Achados de exames andrológicos em touros de corte *Bos taurus* e *Bos indicus*. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 21, 25-28.
- Halnan, C.R.E. , 1989. *Cytogenetics of Animals*. C.A.B. Internacional, London.
- Johnson, W.H., Thompson, J.A., Kumi-Diaka, J., Wilton, J.W., Mandell, I.B., 1995. The determination and correlation of reproductive parameters of performance-tested Hereford and Simmental bulls. *Theriogenology*, 44, 973-982.
- Kieffer, N.M., Cartwright, T.C. Sex Chromosome polymorphism in domestic cattle. *J. Hered.*, 59, p.35-37, 1968.
- MAARA- Ministério da Agricultura e Abastecimento. 1996. Normas para sêmen e Centrais. Portarias n. 25 e 26 de 05 de setembro de 1996. *Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, n.174, 06 de set. de 1996.*
- Moraes, J.C.F., Horn, M.M., Rosado, A., 1998. Avaliação andrológica em touros: Qualidade dos Indicadores da Aptidão reprodutiva em Distintos Grupos Raciais. *Ciência Rural*, 28, 647-652.
- PEPI Computer Programs for Epidemiologic Analysis", 1997. [www. Sagebrushpress.com](http://www.Sagebrushpress.com)
- Pinheiro, L.E.L, Mies Filho, A., Moraes, J.C.F., Van Hoogstranten, M.I.M.J., 1979. Avaliação andrológica de touros com polimorfismo cromossômico. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 3, 23-26.
- Pinheiro, L.E.L, Moraes, J.C.F., Mattevi, M.S., Erdtmann, B., Salzano, F.M., Mies Filho, A., 1980. Two types of Y chromosome in a Brazilian cattle breed. *Caryologia*, 33, 25-32.
- Ribeiro Filho, A.L.; Chalhoub, M.; Aguiar, P.H.P.; Oliveira, J.V.L.; Lopes, R.M.; Vale Filho, V.R.; Andrade, V.J., 1997. Parametros reprodutivos e classificacao andrológica por pontos de touros Nelore PO no Estado da Bahia. *Arq. Med. Vet. Univ. Fed. Bahia.* , 19, 177-188.
- Wurster, D.H., Benirschke, K., 1968. Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma*, 25, 152-171.

Table 1. Mating types used in the south of Brazil to obtain Braford and Brangus-Ibagé bulls.

Type of mating	Offspring	Parents
1	$\frac{1}{2}$	Male Nelore x Female Hereford or Aberdeen Angus
2	$\frac{1}{4}$	Male Hereford or Aberdeen Angus x Female $\frac{1}{2}$
3	$\frac{1}{4}$	Male $\frac{1}{2}$ x Female Hereford or Aberdeen Angus
4	$\frac{3}{8}$	Male Hereford or Aberdeen Angus x Female $\frac{3}{4}$
5	$\frac{3}{8}$	Male $\frac{3}{4}$ x Female Hereford or Aberdeen Angus
6	$\frac{3}{8}$	Male $\frac{1}{2}$ x Female $\frac{1}{4}$
7	$\frac{3}{8}$	Male $\frac{1}{4}$ x Female $\frac{1}{2}$
8	$\frac{3}{8}$	$\frac{3}{8}$ x $\frac{3}{8}$

$\frac{3}{8}$ means $\frac{3}{8}$ Nelore + $\frac{5}{8}$ Hereford or Aberdeen Angus

Table 2. Relationship between the type of parental mating to obtain the synthetic breed and the reproductive soundness of bulls from both breeds.

Type of mating	Braford		Brangus-Ibagé	
	Sound	Unsound	Sound	Unsound
	N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)
1	31 (62)	19 (38)	-	-
2	66 (67)	33 (33)	-	-
3	40 (77)	12 (23)	-	-
4	1 (33)	2 (67)	14(78)	4 (22)
5	23 (85)	4 (15)	-	-
6	38 (58)	27 (42)	-	-
7	83 (69)	37 (31)	-	-
8	41 (71)	17 (29)	145 (83)	30 (17)

Capítulo 4

Evidência de selecção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogénese

(Evidence of differential selection of spermatozoa in the epididymes of hybrid bulls with altered spermatogenesis)

Horn, M.M.¹; Moraes, J.C.F.² Edelweiss, M.I.A.³

¹Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil;

²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil;

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Aceito para publicação na Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.544, dez., 2002

Evidência de selecção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogénese

(Evidence of differential selection of spermatozoa in the epididymes of hybrid bulls with altered spermatogenesis)

Horn, M.M.¹; Moraes, J.C.F.² Edelweiss, M.I.A.³

¹Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil;

²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil;

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Resumo: O objectivo deste estudo foi o de avaliar a intensidade da redução de células espermáticas anómalas ao longo do epidídimo em touros de uma raça híbrida, com espermatogénese normal e alterada. Foram utilizados testículos de 12 touros oriundos de cruzamentos entre as raças Hereford e Nelore, dos quais foram colhidas amostras de esperma da cabeça, parte proximal do corpo, parte distal do corpo e da cauda do epidídimo para avaliação da morfologia espermática sob contraste de fase e em lâmina corada. Foi constatada redução significativa no percentual de gota citoplasmática proximal, distal e no total de defeitos, ao longo do epidídimo de touros com espermatogénese considerada normal, alterada e variável. A constatação de significativas variações para gota citoplasmática proximal e defeitos totais ao longo do epidídimo nos grupos de touros sintéticos avaliados, constitui-se numa evidência de que os touros com espermatogénese alterada não têm a mesma capacidade de redução de formas espermáticas anómalas, que os considerados com espermatogénese normal. A provável origem desta diferença permanece sem explicação. Porém, a dinâmica da frequência da gota citoplasmática proximal pode ser

um indicador sensível da qualidade espermática e classificação da fertilidade potencial de animais de raças híbridas.

Summary: The objective of this work was to evaluate the intensity of the reduction of abnormal spermatic cells along the length of the epididymis in bulls of synthetic breeds with normal and altered spermatogenesis. Semen samples were collected from the head, proximal part of the body, distal part of the body and from the tail of the epididymis of twelve crossbred Hereford + Nelore bulls. Spermatic morphology was microscopically evaluated under phase contrast and after staining. A significant reduction in the percentage of the proximal cytoplasmic droplet was detected and in total defects excluding distal cytoplasmic droplets, along the epididymis of bulls with spermatogenesis considered normal, altered or variable. The results indicate that bulls with altered spermatogenesis do not have the same reducing capacity of abnormal sperm forms along the epididymis as those bulls considered to have normal spermatogenesis. The origin of this difference remains obscure, however, the dynamics of the frequency of the proximal cytoplasmic droplet can be a sensitive indicator of spermatic quality, and could be used to classify animals of synthetic breeds as to their potential fertility.

Introdução

O número total de células espermáticas produzidas pelos testículos de bovinos é superior às reservas espermáticas extra-gonadais, sugerindo que há redução na população de espermatozoides ao longo dos ductos eferentes (Almquist & Amann, 1961). Esta redução é relacionada com a selecção de espermatozoides, com determinados tipos de

defeitos, durante sua passagem pelo epidídimo (Rao et al., 1980). A selecção de espermatozóides anómalos também foi descrita em coelhos (Perez-Sanchez et al., 1997) e em gatos (Axnér et al., 1999). No nível celular, este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Existem evidências de fagocitose das células espermáticas anómalas pelas células epiteliais da *rete testis* e ductos eferentes em bovinos (Crabo et al., 1971; Sinowatz et al., 1979; Goyal, 1982) e ratos (Hoffer et al., 1975) e por macrófagos intra-epiteliais na cauda do epidídimo (Chacón, 2001).

A migração da gota citoplasmática da região proximal para a distal da peça intermediária do espermatozóide durante a passagem pelo epidídimo tem sido um achado unânime (Crabo et al., 1971; Sinowatz et al., 1979; Rao et al., 1980; Goyal, 1982). Segundo Hancock (1955), a migração está relacionada com a maturação espermática e com a aquisição de motilidade. A migração da gota citoplasmática, porém, difere no local onde se inicia, de acordo com a espécie. Nos bovinos, a migração tem início na porção proximal do corpo (Rao et al., 1980), e nos gatos, na porção distal do corpo do epidídimo (Axnér et al., 1999). A indicação de que a gota citoplasmática proximal é um defeito espermático, vem dos achados de altas frequências nos ejaculados de touros com alterações na fertilidade (Rao et al., 1980). Este facto, tem sido reiterado por diversos estudos, e entre estes, Chacón (2001) observou em touros zebu de diversas raças, maior percentual de gota citoplasmática proximal no ejaculado de touros com idade inferior a dois anos e também, em touros considerados inaptos à reprodução.

O fenómeno de selecção de células anómalas durante sua passagem pelo epidídimo é um modelo interessante para avaliar a função reprodutiva de touros de raças híbridas que apresentem maiores índices de refugo por má qualidade de sémen, facto que tem sido

observado em diversos estudos (Chenoweth et al., 1996; Moraes et al., 1998; Chacón et al., 1999). Esta forma de abordagem é justificada por estudos anteriores em touros Braford, cuja deficiente qualidade seminal foi persistente num período de seis meses, em contraste, com animais da raça Hereford que apresentaram melhoria nesse período, caracterizando, assim, uma possível condição peculiar dos touros híbridos (Horn et al., 2002).

O objectivo deste estudo foi o de investigar a selecção de células espermáticas durante a passagem pelo epidídimo em touros oriundos de cruzamentos entre taurinos e zebuínos que apresentem ou não uma alteração permanente na espermatogênese, caracterizada por alto percentual de defeitos espermáticos.

Material e Métodos

Foram utilizados epidídimos de 12 touros oriundos de cruzamento entre as raças Hereford e Nelore, contemporâneos com cerca de 24 meses de idade, abatidos em matadouro. Os animais foram previamente classificados quanto à condição reprodutiva (aptos ou inaptos) no local de origem. Os exames andrológicos foram efectuados entre 15 e 30 dias antes do abate dos animais, incluindo exame clínico da genitália, aferição da motilidade dos espermatozóides e avaliação da morfologia espermática. Foram considerados como inaptos os touros, com motilidade espermática inferior a 70%, e, percentagem de espermatozóides com defeitos superior a 30% (MAARA, 1996). Assim, com o objectivo de classificar com maior precisão os animais com alteração permanente na espermatogênese, foi realizada uma nova classificação quanto à morfologia espermática, através de uma amostra de sémen retirada da cauda do epidídimo após o abate. Nesta avaliação, foram observados todos os defeitos espermáticos e a gota citoplasmática

proximal. A gota citoplasmática distal não foi considerada como um defeito para a nova classificação, por tratar-se de uma característica espermática considerada fisiológica na cauda do epidídimo. Esta nova classificação quanto a espermatogênese foi efectuada pela impossibilidade de acompanhar o quadro espermático dos touros com deficiente qualidade seminal, indicando os animais com uma alteração permanente no quadro espermático, evidenciada anteriormente (Horn et al., 2002).

Assim, os touros foram classificados quanto a sua espermatogénese nos seguintes grupos:

- Grupo A: aptos na propriedade de origem e com taxa inferior a 30% de anomalias espermáticas na cauda do epidídimo post-mortem;
- Grupo B: inaptos na propriedade de origem e com taxa superior a 30% de anomalias espermáticas na cauda do epidídimo post-mortem;
- Grupo C: inaptos na propriedade de origem, porém com taxa inferior a 30% de anomalias espermáticas na cauda do epidídimo post-mortem. Índices característicos de animais não portadores de uma alteração permanente na espermatogênese.

Para a avaliação do percentual de defeitos durante a passagem pelo epidídimo, a recolha de espermatozóides foi feita em quatro regiões: cabeça, corpo proximal (corpo 1), corpo distal (corpo 2) e cauda. O material foi colhido de um dos epidídimos de cada touro, escolhido ao acaso. Foi retirado um fragmento de aproximadamente 0,5 cm das referidas regiões do epidídimo e mergulhado em uma solução de citrato de sódio 2,94% e com adição de 4% de formalina comercial, para que os espermatozóides fossem liberados no líquido para posterior análise em câmara húmida, sob contraste de fase, com um aumento de 1000x. De cada porção do epidídimo foram colhidos espermatozóides através de contato

em lâmina pré-aquecida, posteriormente corados pela técnica de Cerovysk (1976) para avaliação em microscopia convencional (1000x). Foram observadas 200 células em cada método. Os defeitos espermáticos foram classificados nos seguintes conjuntos: CAB, defeitos de cabeça (estreita na base, piriforme, contorno anormal, alterações de tamanho), avaliados no material em lâmina corada; PI, defeitos de peça intermediária (sinuosa, aplasia, edemaciada); CD, defeitos de cauda (cauda simplesmente dobrada, fortemente enrolada, dobrada na porção terminal); ACRO, defeitos de acrossoma (contorno irregular, rompido) e GCP, gotas citoplasmáticas proximais e GCD, gotas citoplasmáticas distais nas avaliações sob contraste de fase.

As percentagens das características espermáticas foram transformadas em “ranks”, transformação em função de seu ordenamento nos dados originais, e, submetidas a análise de variância de dois factores: classificação dos touros (Grupos A, B e C) e porção do epidídimo (cabeça, corpo 1, corpo 2 e cauda), empregando o teste de comparação múltipla de Duncan, num nível de significância de 5%. (Hintze, 1996).

Resultados

De acordo com os critérios definidos anteriormente (cf. “Materiais e Métodos), os touros avaliados foram distribuídos nos seguintes grupos: Grupo A, n=2; Grupo B, n=4; Grupo C, n=6.

As médias dos defeitos espermáticos, nas quatro porções do epidídimo, obtidas nos grupos de touros classificados quanto à morfologia espermática, estão apresentadas na Tabela 1. Os defeitos de CAB, PI e CAU foram mais frequentes nos touros do grupo B. No que diz respeito a GCP, os touros com alteração na espermatogênese (grupos B e C) foram

semelhantes, porém com uma frequência superior aos touros com espermatogênese normal (grupo A). Na Figura 1 são apresentadas as médias da interação ($P < 0,05$) entre os grupos de touros e as porções do epidídimo para a GCP e total de defeitos, indicativas do comportamento diferencial ao longo do epidídimo nos animais classificados quanto à qualidade seminal. Nesta Figura, em “a” pode ser verificado que os touros considerados com espermatogênese normal apresentaram uma redução de 81% no percentual de GCP da cabeça para a cauda do epidídimo. Em contraste, aqueles classificados no grupo B apresentaram apenas uma redução de 30%, com manutenção de um percentual de 22% de GCP na cauda do epidídimo. O grupo C, que apresentou a maior frequência de GCP na cabeça do epidídimo, apresentou também padrão semelhante ao do grupo A quanto à redução e quanto ao percentual final na cauda do epidídimo. Ainda na Figura 1, em “b” pode ser visualizada a dinâmica da selecção espermática diferencial da cabeça para a cauda do epidídimo nos três grupos de touros. Os touros com espermatogênese alterada (grupo B) apresentaram apenas uma redução de 36%, contrastando com os touros do grupo A, cujo percentual de redução foi de 79% e na magnitude final dos espermatozóides com defeito, respectivamente de 55% e 10%.

Os resultados da análise do percentual dos defeitos espermáticos ao longo do epidídimo de todos os touros mostram diferenças significativas para a gota citoplasmática proximal, total de defeitos e GCD (Tabela 2). A GCP e o total de defeitos apresentaram uma redução significativa da cabeça para a primeira porção do corpo do epidídimo. Já a GCD, apresentou um aumento percentual praticamente linear da cabeça para a cauda do epidídimo.

Discussão

As diferenças significativas entre as regiões do epidídimo e os grupos A, B e C, na incidência de gota citoplasmática proximal e defeitos totais (Figura 1), se constituem no principal achado deste ensaio, demonstrando uma menor redução no percentual de GCP e defeitos espermáticos totais nos animais do grupo B, classificados como portadores da alteração característica na espermatogênese nos touros de raças híbridas.

Da cabeça do epidídimo até a primeira porção do corpo, ocorreu a maior divergência entre os grupos de touros em relação à frequência da GCP. Os padrões de deslocamento da GCP permitem separar os touros do Grupo A dos restantes animais com problemas de fertilidade. No entanto a persistência de em média 22% de GCP na cauda do epidídimo dos touros do Grupo B, pode ser um indicativo de uma deficiente seleção de defeitos espermáticos ao longo do epidídimo, reiterando outros estudos em animais com espermatogênese normal e alterada (Rao et al., 1980).

A nova classificação empregada foi útil para reiterar que nos touros do Grupo B o quadro espermático é permanente. A hipótese de que as variações no quadro espermático teriam origem degenerativa (Horn et al., 1999) e que a maior frequência de animais classificados como inaptos no exame andrológico seria decorrentes dos critérios que não consideram as peculiaridades inerentes a cada conjunto racial (Moraes et al., 1998) foi refutada. A continuidade dos estudos nesses animais permitiu a constatação de que se trata efectivamente de uma condição permanente em alguns animais (Horn et al., 2002). O que se pode inferir é que os animais incluídos no grupo A, apresentavam espermatogênese normal, os do grupo B seriam os portadores da alteração na espermatogênese em estudo e aqueles incluídos no grupo C, eram animais com um processo degenerativo testicular

transitório. Essa interpretação é justificada pelas médias dos defeitos espermáticos apresentados na Tabela 1, que foram os indicadores empregados para a investigação da função testicular nestes touros.

As variações espermáticas individuais que sofreram mudanças significativas nas suas frequências durante o trânsito pelo epidídimo foram GCP e GCD (Tabela 2). Relativamente à estas últimas, este fenómeno é fisiológico, sendo considerado um processo relacionado à maturação espermática. Entretanto, a detecção de GCP no ejaculado indica uma alteração na espermatogênese (Rao et al., 1980; Chacón, 2001). Também foi observada uma significativa redução no percentual de defeitos espermáticos totais, isto é explicado pela redução da gota citoplasmática proximal desde a cabeça até a cauda do epidídimo e o somatório dos desvios não significativos das demais classes de defeitos espermáticos.

O padrão distinto no deslocamento da GCP nos grupos de touros classificados quanto a espermatogênese evidenciado no presente estudo, parece constituir um indicador sensível da função testicular, em touros de raças sintéticas oriundos de cruzamentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelas facilidades e animais, ao programa MCT-PRONEX pelo suporte financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Bibliografia

- ALMQUIST, J.O.; AMANN, R.P. (1961). Reproductive capacity of dairy bulls. II. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves as determined by direct counts and depletion trials; dimensions and weight of genitalia. *J. Dairy Sci.*, 44:1668-1678.
- AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSSON, S. (1999). Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 52:767-778.
- CEROVSKY, J. (1976). A new staining procedure for boar spermatozoa. *Zivocisna Vyroba*, 21:361-362.
- CHACÓN, J.C. (2001). Assessment of sperm morphology in Zebu bulls under field conditions in the tropics. *Reprod. Domest. Anim.*, 36:91-99.
- CHACÓN, J.C. MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1999). Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. *Theriogenology*, 52:221-231.
- CHENOWETH, P.J.; CHASE JR, C.C; LARSEN, R.E.; THATCHER, M.J.D.; BIVENS, J.F.; WILCOX, C.J. (1996). The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. *Applied Anim. Behaviour Sci.*, 48:225-236.
- CRABO, B.; GUSTAFSSON, B.; NICANDER, L.; RAO, R.A. (1971). Subnormal testicular function in a bull concealed by phagocytosis of abnormal spermatozoa in the efferent ductules. *J. Reprod. Fert.*, 26:393-396.
- GOYAL, H.O. (1982). Light microscopic and ultrastructural evidence of epithelial phagocytosis of sperm in the rete testis and ductuli efferentes in the bull. *Am. J. Vet. Res.*, 43:785-790.
- HANCOCK, J.L. (1955). The disintegration of bull spermatozoa. *Vet. Rec.*, 67:825-826.
- HINTZE, J.L. (1996). NCSS 6.0. User's guide. Kaysville, Utah, 2204 p.
- HOFFER, A.P.; HAMILTON, D.W.; FAWCETT, D.W. (1975). Phagocytosis of spermatozoa by the epithelial cells of the ductuli efferentes after epididymal obstruction in the rat. *J. Reprod. Fert.*, 44:1-9.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; GALINA, C.S. (1999). Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé em frente à degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. *Ciência Rural*, 29: 523-526.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; MACIEL, M.N. (2002). Variação estacional da qualidade seminal em touros de genótipo puro europeu e sintético derivado. *Rev. Bras. Reprod. Anim. In press.*

- MAARA- Ministério da Agricultura e Abastecimento. (1996). Normas para sêmen e Centrais. Portarias n. 25 e 26 de 05 de setembro de 1996. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, n.174, 06 de set. de 1996.
- MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO, A. (1998). Avaliação andrológica em touros: Qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. *Ciência Rural*, 28:647-652.
- PEREZ-SANCHEZ, F.; TABLADO, L.; SOLER, C. (1997). Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology*, 47:893-901.
- RAO, R. A.; BANE, A. GUSTAFSSON, B.K. (1980). Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, 14:1-12.
- SINOWATZ, F.; WROBEL, K.H.; SINOWATZ, S.; KUGLER, P. (1979). Ultrastructural evidence for phagocytosis of spermatozoa in the bovine rete testis and testicular straight tubules. *J. Reprod. Fert.*, 57:1-4.

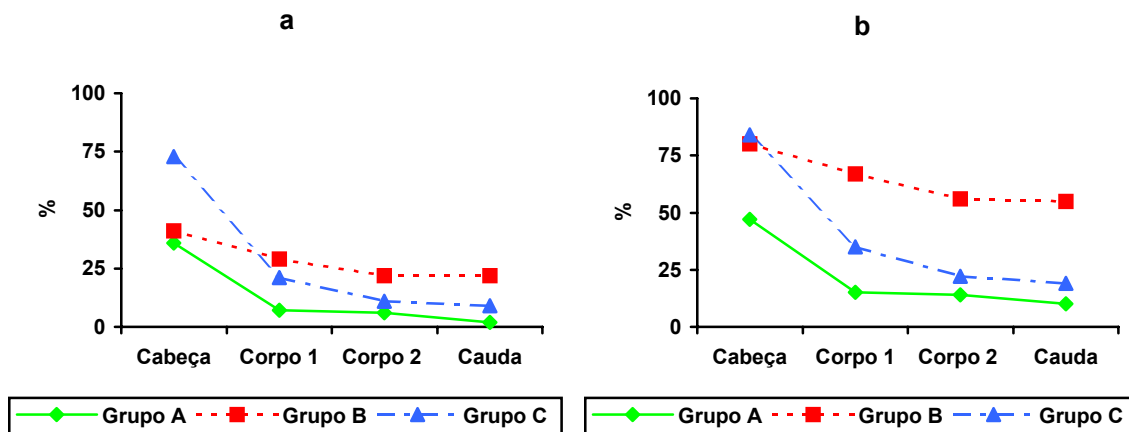


Figura 1- Variação na frequência da gota citoplasmática proximal (a) e do percentual total de espermatozoides anormais nos touros dos distintos grupos (b).

Tabela 1- Médias dos defeitos espermáticos avaliados ao longo do epidídimo, nos dois critérios de avaliação quanto a aptidão reprodutiva.

Defeitos espermáticos	Grupo A [#]	Grupo B ^{##}	Grupo C ^{###}
CAB	4,4±4,6 ^a	24,3±3,3 ^b	6,6±2,7 ^a
PI	1,7±1,2 ^a	5,4±0,8 ^b	1,9±0,7 ^a
CD	2,4±1,5	6,3±1,2	3,2±0,9
ACRO	0,3±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
GCP	12,6±4,7 ^a	28,6±3,3 ^b	28,3±2,7 ^b
Total*	21,3 ±5,9 ^a	64,6±4,2 ^b	40,3±3,4 ^c

[#]touros classificados como aptos na propriedade de origem, com taxa inferior a 30% de defeitos na cauda do epidídimo post-mortem;

^{##}touros classificados como inaptos na propriedade de origem, com taxa superior a 30% de defeitos na cauda do epidídimo post-mortem;

^{###}touros classificados como inaptos na propriedade de origem, com taxa inferior a 30% de defeitos na cauda do epidídimo post-mortem;

* somatório dos defeitos espermático, exceto GCD;

** letras diferentes nas linhas indicam diferença nos grupos (P<0,05).

Tabela 2- Médias dos defeitos espermáticos observados ao longo do epidídimo.

Porção do epidídimo	CAB	PI	CD	ACRO	GCP	GCD	Total*
Cabeça	13,2±3,8 ^a	2,3 ± 0,9 ^a	4,9 ±1,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	49,9±3,8 ^a	18.5±4.2 ^a	70,4±4,8 ^a
Corpo 1	12,9±3,8 ^a	2,3 ± 0,9 ^a	4,5 ±1,2 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	18,9±3,8 ^b	39.5±4.2 ^b	39,1±4,8
Corpo 2	10,2±3,8 ^a	4,4 ± 0,9 ^a	3,2 ±1,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	13,1±3,8 ^b	50.6±4.2 ^b	30,8±4,8
Cauda	10,8±3,8 ^a	2,9 ± 0,9 ^a	3,3 ±1,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	10,8±3,8 ^b	56.5±4.2 ^c	28,0±4,8

* somatório dos defeitos espermático, exceto GCD;

** letras diferentes nas colunas indicam diferença entre as porções do epidídimo (P<0,05).

Capítulo 5

Quantificação dos estádios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com qualidade de sêmen normal ou alterada

(Staging spermatogenic cycle in synthetic bulls with normal and altered semen quality)

**Marilise Mesquita Horn¹; José Carlos Ferrugem Moraes²; Maria Isabel Albano
Edelweiss³**

Artigo aceito para publicação na Revista Ciência Rural, volume 34, nº 1, 2004.

¹ Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

² Pesquisador Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS. E-mail: ferrugem@cppsul.embrapa.br. Autor para correspondência.

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UFRGS.

**QUANTIFICAÇÃO DOS ESTÁDIOS DO CICLO
ESPERMATOGÊNICO EM TOUROS DE RAÇAS SINTÉTICAS COM
QUALIDADE DE SÊMEN NORMAL OU ALTERADA
STAGING SPERMATOGENIC CYCLE IN SYNTHETIC BULLS WITH NORMAL AND ALTERED
SEMEN QUALITY**

**Marilise Mesquita Horn⁴; José Carlos Ferrugem Moraes⁵; Maria Isabel Albano
Edelweiss⁶**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar qual a frequência dos túbulos seminíferos nos diferentes estádios do ciclo espermatogênico em touros de duas raças sintéticas, sendo 12 Braford e 8 Brangus-Ibagé, classificados em aptos (grupos A) e inaptos (grupos B) à reprodução, de acordo com o exame andrológico. Os estádios avaliados foram representativos das fases proliferativa (estádio I), meiótica (estádio II) e de maturação (estádio III) da espermatogênese. Os touros Braford apresentaram frequências diferentes entre os grupos A e B nos estádios II e III. Os touros Brangus-Ibagé apresentaram diferenças entre os grupos apenas para o estágio II. Os resultados indicam que nas fases iniciais do ciclo espermatogênico (estágio I), os touros de raças sintéticas, classificados quanto a qualidade seminal, apresentam gametogênese semelhante. Nas fases em que ocorrem as divisões meióticas (estádio II) e a maturação das espermátides (estádio III) é quando se manifestam as alterações na espermatogênese que respondem pela classificação diferencial dos touros. O uso do presente agrupamento de estádios do ciclo espermatogênico, proporciona uma maneira prática de avaliar a dinâmica do epitélio germinativo em touros aptos e inaptos à reprodução.

Palavras chave: *avaliação histológica, espermatogênese, touros sintéticos*

⁴ Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

⁵ Pesquisador Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS. E-mail: ferrugem@cppsul.embrapa.br. Autor para correspondência.

⁶ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UFRGS.

SUMMARY

This study investigated the frequency of different stages of spermatogenic cycle in synthetic bulls from Braford (n=12) and from Brangus-Ibagé (n=8) breed with normal (Group A) and altered (Group B) semen quality, by andrological examination. The staging criteria includes the proliferative (stage I), meiotic (stage II) and the maturational (stage III) periods of the spermatogenesis. The Braford bulls presented different frequencies between groups within stages II and III. Among Brangus-Ibagé bulls there were different frequencies between groups just for stage II. The results indicated that spermatogenesis progress adequately in the stage I on synthetic bulls with different semen quality. During the meiotic (stage II) and spermatid maturation period (stage III), occurred the disturbs in the spermatogenesis of the unsound bulls. The present proposition to cluster the stages of the spermatogenic cycle, forgives a practical method to evaluate the dynamic of germinative epithelium in bulls with different breeding soundness classification.

Key words: *staging, spermatogenesis, synthetic bulls*

INTRODUÇÃO

Uma importante fonte de prejuízo nos sistemas de produção de bovinos de corte é o descarte de touros por alterações na qualidade do sêmen. Com maior frequência os touros de raças sintéticas são considerados inaptos à reprodução em relação aos de raças puras (CHENOWETH *et al.*, 1996; MORAES *et al.*, 1998; CHACÓN *et al.*, 1999). Neste contexto, foi verificado que existem diferenças na qualidade do sêmen de touros de raças sintéticas em comparação com touros puros, quanto a potencialidade de recuperação dos indicadores qualitativos do sêmen em seis meses de acompanhamento (HORN *et al.*, 2002). No entanto, essas diferenças não foram detectadas quando touros puros e de raças sintéticas foram submetidos a degeneração testicular experimental induzida por dexametasona (HORN *et al.*, 1999). Um melhor entendimento da etiologia deste maior percentual de descarte em touros oriundos de cruzamentos pode ser obtido por estudos citológicos nos túbulos seminíferos, responsáveis diretos pela produção dos espermatozoides.

A espermatogênese é um processo complexo, com inúmeras associações celulares não casuais. O ciclo espermatogênico do rato foi detalhadamente classificado em quatorze estádios, baseados na morfologia

das espermátides (LEBLOND & CLERMONT, 1952). AMANN (1962) descreveu para touros uma classificação mais simplificada com apenas oito estádios. As diferenças nas classificações entre espécies decorrem das células da linhagem espermática que são consideradas.

A avaliação histológica é um instrumento útil para quantificar a espermatogênese, sendo que cerca de 10-11% dos túbulos seminíferos em estágio VIII, caracterizam um bovino com função gametogênica normal (AMANN, 1962). As frequências encontradas para os demais estádios em touros de origem européia foram: 30% estágio I, 16% estágio II, 17% estágio III, 10% estágio IV, 2% estágio V, 6% estágio VI, 8% estágio VII. Neste sentido, RUSSEL *et al.* (1990) salientaram que a divisão do ciclo espermático em muitos estádios, apenas traz benefícios para uma pesquisa de extremo detalhe e que em algumas circunstâncias pode ser prudente agrupar ou selecionar apenas alguns estádios, visando facilitar as análises. Neste estudo o ciclo espermático é agrupado nas suas três fases características: a proliferativa ou spermatogonial, na qual as spermatogônias por mitose dão origem aos spermatócitos; a fase meiótica, que inclui as divisões reducionais; e, a fase de diferenciação ou spermiogênica, que é caracterizada pela diferenciação das espermátides em espermatozoides (CLERMONT, 1972; RUSSEL *et al.*, 1990). Os estádios do ciclo espermático podem ser interrompidos por deficiente produção de fatores de crescimento como o *epidermal growth factor* (TSUTSUMI *et al.*, 1986). A produção de interleucinas pelas células de Sertoli também varia de acordo com os diferentes estádios do ciclo espermático (GÉRARD *et al.*, 1992; SYED *et al.*, 1993).

O objetivo deste estudo foi avaliar qual a frequência de túbulos seminíferos nos diferentes estádios do ciclo espermático em touros aptos e inaptos à reprodução de raças sintéticas de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 touros Braford e 8 Brangus-Ibagé, de dois anos de idade, criados para atuarem como reprodutores, provenientes de duas propriedades localizadas no sul do Rio Grande do Sul. Os animais foram previamente classificados quanto à condição reprodutiva, em função da qualidade do sêmen, na propriedade de origem, em aptos e inaptos segundo as recomendações do MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (1996). Os critérios que caracterizam os touros como aptos são de que os animais não apresentem alterações clínicas no sistema genital, motilidade espermática superior a 70%

e no máximo 30% de espermatozóides anormais. Os touros foram abatidos no frigorífico por descarte zootécnico (aptos à reprodução) ou por má qualidade de sêmen (inaptos à reprodução). Logo após o abate, foi coletada uma porção de 2 cm³ de um testículo de cada animal, colocada em Bouin por 24 horas, sendo logo após transferida para álcool 70 °GL. Os fragmentos foram tratados em um processador automático de tecidos, para a posterior confecção dos blocos de parafina e cortes com espessura de 4µm, submetidos a coloração de Hematoxilina-eosina.

Os touros Braford foram abatidos com intervalos entre 15 e 30 dias da última avaliação seminal, em função disso, no momento do abate, foi colhido sêmen da cauda do epidídimo para análise morfológica dos espermatozóides em lâmina corada e contraste de fase em formol salino. Estes animais foram novamente classificados em função do percentual de defeitos espermáticos encontrados na cauda do epidídimo. Para esta segunda classificação, foram considerados todos os defeitos espermáticos e gota citoplasmática proximal. Os touros foram então classificados em: Grupo A: dois touros aptos na propriedade de origem e com taxa inferior a 30% de defeitos na cauda do epidídimo *post-mortem*; Grupo B: quatro touros inaptos na propriedade de origem e com taxa superior a 30% de defeitos na cauda do epidídimo *post-mortem*; Grupo C: seis touros inaptos na propriedade de origem, porém com taxa inferior a 30% de defeitos na cauda do epidídimo *post-mortem*. Já para os touros Brangus-Ibagé apenas foi considerada a classificação da propriedade de origem (grupo A, três touros aptos à reprodução e grupo B, cinco touros inaptos à reprodução).

A análise dos estádios foi realizada com base na classificação de AMANN (1962), porém com o agrupamento dos estádios I e II; III e IV; V-VIII. Na tabela 1 estão apresentadas as associações celulares características de cada estágio utilizado para a avaliação da espermatogênese, comparativamente à proposta original. Este agrupamento dos estádios do ciclo permitiu a avaliação dos momentos do ciclo espermático que apresentam importância similar. O estágio I inclui como evento principal a mitose das espermatogônias em pré-leptoteno e espermátocito leptoteno e espermátides arredondadas ou levemente alongadas. O estágio II caracteriza a fase meiótica, quando ocorrem as divisões celulares reducionais e as células passam de espermátocitos para espermátides jovens. Os túbulos em estágio III representam a fase da maturação em que ocorre a transformação das espermátides em espermatozóides.

As comparações das freqüências dos diversos estádios da espermatogênese nos dois conjuntos raciais de touros, classificados quanto a condição reprodutiva foram efetivadas através do teste do Qui-quadrado,

com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 são apresentados os resultados da quantificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero nos touros da raça Braford. Foi constatada diferença na frequência dos estádios entre os três grupos de touros ($\chi^2=21,01$; 4 GL; $P<0,001$). Quando se considerou apenas os touros dos grupos A e B, ou seja, os animais avaliados duplamente quanto a morfologia espermática, na propriedade e no *pos-mortem*, foi possível observar apenas diferenças significativas para os estádios II e III ($\chi^2= 9,58$; 1 GL; $P<0,001$). No que diz respeito ao estágio II, caracterizado pelas meiose dos espermátocitos primários e secundários, resultando nas espermátides, o grupo A apresentou 22% e o grupo B 27%. A comparação dos touros do grupo A com o conjunto dos touros B+C, que conjuntamente apresentaram frequências de 43%, 29% e 29%, respectivamente para os estádios I, II e III, indica também a mesma tendência observada na comparação efetuada apenas com o grupo B ($\chi^2= 10,46$; 2 GL; $P<0,01$). O fato dos touros com baixa qualidade de sêmen apresentarem maior percentual destes estádios, pode ser uma indicação de um bloqueio nas divisões celulares, decorrente de uma interrupção no ciclo celular neste ponto, ou ainda, pela inativação de determinados genes envolvidos na meiose (EDDY, 2002). Estes resultados reiteram os de AMANN (1962), que observou nos primeiros três quartos da espermatogênese, perdas que vão de 4% em touros jovens até 19% em touros maduros. O estágio III também foi diferente nos grupos A e B dos touros Braford, sendo respectivamente de 34% e 27%. Os touros do grupo A, apresentaram um maior percentual de túbulos nos estádios finais do ciclo, o que pode estar relacionado a maior produção de células espermáticas normais, indicando, ainda, menores perdas na espermatogênese e consecução das etapas anteriores.

Na tabela 3 são apresentadas as frequências de túbulos seminíferos avaliados nos touros Brangus-Ibagé. Apenas o estágio II foi diferente entre os grupos A e B, respectivamente com sêmen qualitativamente normal e alterado ($\chi^2= 7,88$; 2 GL; $P<0,05$), apresentando 27% nos touros do grupo A e 32% nos do grupo B. Este resultado é semelhante ao constatado nos touros Braford, permitindo concluir que no estágio I não se expressam diferenças entre os touros classificados quanto a qualidade seminal, mesmo sendo este o estágio mais longo do ciclo (AMANN, 1962). Adicionalmente, é possível inferir que os fenômenos que ocorrem neste período do ciclo espermatogênico são menos dependentes de fatores ambientais ou genéticos, neste caso

relacionados ao cruzamento entre as duas sub-espécies de bovinos. A ocorrência de menor frequência de estádios II nos touros Brangus-Ibagé do grupo A, reitera os resultados obtidos nos touros da outra raça sintética, reforçando que a fase do ciclo em que ocorrem as meioses é a mais relacionada com a qualidade seminal. No entanto, neste conjunto racial a fase de maturação apresentou frequências semelhantes entre os dois grupos, contrastando com o grupo de touros Braford, cuja diferença nesta fase pode estar relacionada aos tipos de cruzamentos utilizados para a formação dessa raça sintética (Horn et al. In press). Este fato é reiterado pela comparação entre os touros inaptos dos dois conjuntos raciais, que indicou frequências distintas nos três estádios ($\chi^2= 28,83$; 2 GL; $P<0,001$). Uma diminuição na produção de espermátides redondas (estádio II) também foi identificada em ratos que tiveram a glândula submandibular retirada (principal órgão secretor de EGF- *epidermal growth factor*), sugerindo que a falta deste fator de crescimento esteja relacionada a divisão celular (TSUTSUMI *et al.*, 1986). O TGF α (*transforming growth factor α*) é biológica e estruturalmente semelhante ao EGF e estes fatores estão relacionados a proliferação celular no testículo (LEVINE *et al.*, 2000). A deficiência destes fatores, produzidos pelas células de Sertoli e germinativas (SKINNER *et al.*, 1991), podem estar relacionadas com a alteração na qualidade seminal e frequência diferencial dos estádios II no ciclo espermático.

CONCLUSÃO

O estágio inicial do ciclo espermático apresenta funcionalidade similar em touros de raças sintéticas classificados quanto a qualidade seminal em normais e alterados. Nas fases em que ocorrem as divisões meióticas (estádio II) e a maturação das espermátides (estádio III) é quando se manifestam as alterações na espermatogênese que respondem pela classificação diferencial dos touros. O uso do agrupamento de estádios do ciclo espermático, proporciona uma maneira mais prática para avaliar a cinética do epitélio germinativo em touros aptos e inaptos à reprodução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. **The American Journal of Anatomy**, v.110, p.49-78, 1962.

- CHACÓN, J.C. MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; et al. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v.52, p.221-231, 1999.
- CHENOWETH, P.J.; CHASE JR, C.C; LARSEN, R.E.; et al. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.48, n.3-4, p.225-236, july, 1996.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiology Reviews**, v.52, p.198-236, 1972.
- EDDY, E.M. Male germ cell gene expression. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, n.1, p.103-128, 2002.
- GERARD, N.; SYED, V.; JEGOU, B. Lipopolysaccharide, latex beads and residual bodies are potent activators of Sertoli cell interleukin-1 α production. **Biophysical Biochemical Research Communications**, v.185, p.154-161, 1992.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; GALINA, C.S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé em frente à degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural**, v.29, n.3, p. 523-526, 1999.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; MACIEL, M.N. Variação temporal da qualidade seminal em touros de genótipo puro europeu e sintético derivado. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. No prelo, 2002.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; ROSADO, A.; EDELWEISS, M.I.A. The reproductive deficiency of bulls of synthetic breeds according to the morphology of the Y chromosome and the type of cross-breeding. Submitted.

- LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfuric acid" technique. **The American Journal of Anatomy**, v.99, p.391-413, 1952.
- LEVINE, E.; CUPP, A.S.; MIYASHIRO, L.; et al. Role of transforming growing factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development. **Biology of Reproduction**, v.62, p.477-490, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Normas para sêmen e Centrais**. Portarias n. 25 e 26 de 05 de setembro de 1996. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, n.174, 06 de set. de 1996.
- MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO, A. Avaliação andrológica em touros: Qualidade dos Indicadores da Aptidão reprodutiva em Distintos Grupos Raciais. **Ciência Rural**, v.28, n.4, p. 647-652, 1998.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**, v.12, p.45-77, 1991.
- SYED, V.; GERARD, N.; KAIPIA, A.; et al. Identification, ontogeny, and regulation of an interleucine-6-like factor in the rat seminiferous tubule. **Endocrinology**, v.132, n.1, p.293-299, 1993.
- RUSSEL, L.D. ETTLIN, R.A.; SINHAHIKIM, A.P.; et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River , Clearwater, 1990, 286 p.
- TSUTSUMI, O.; KURACHI, H.; OKA, T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproduction function. **Science**, v.233, p.975-977, 1986.

Tabela 1. Critério de classificação para avaliação dos estádios ciclo espermático bovino.

Presente estudo	Classificação de Amann (1962)	Características
I	I + II	População celular composta de espermatogônias, espermátocitos jovens em fase de pré-leptóteno e/ou leptóteno, espermátocitos velhos em paquíteno e uma geração de espermátides arredondadas ou levemente alongadas.
II	III + IV	População celular composta de espermátocitos jovens em leptóteno e zigóteno, espermátocitos velhos em paquíteno ou diplóteno, células em divisão meiótica e/ou espermátocitos secundários e espermátides alongadas.
III	V - VIII	População celular composta de espermatogônias, espermátocitos em paquíteno, espermátides jovens arredondadas e espermátides alongadas justapostas as células de Sertoli ou prontas para espermição.

Tabela 2. Número e freqüência de estádios do ciclo do epitélio seminífero em 3496 túbulos avaliados em 12 touros Braford classificados quanto à fertilidade potencial.

Grupo de touros	Estádio I	Estádio II	Estádio III
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
A	227 (44) ^a	114(22) ^c	175(34) ^e
B	548(46) ^b	323(27) ^d	318(27) ^f
C	720(40)	528(29)	546(30)

Grupo A, aptos na propriedade, com taxa de defeitos espermáticos <30% na cauda do epidídimo;
 Grupo B, inaptos na propriedade, com taxa de defeitos espermáticos >30% na cauda do epidídimo;
 Grupo C, inaptos na propriedade, com taxa de defeitos espermáticos <30% na cauda do epidídimo;
 Comparação entre os três grupos e os três estádios: $\chi^2=21,01$; 4 GL; P<0,001.
 Comparação entre a, b: $\chi^2=0,64$; 1 GL; P=0,42.
 Comparação entre c, d, e, f: $\chi^2=9,58$; 1 GL; P<0,001.

Tabela 3. Número e freqüência de estádios do ciclo do epitélio seminífero em 2392 túbulos avaliados em oito touros Brangus-Ibagé classificados quanto à fertilidade potencial.

Grupo de touros	Estádio I	Estádio II	Estádio III
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
A	442(49) ^a	239(27)	216(24)
B	696(47) ^b	478(32)	321(21)

Grupo A, aptos na avaliação andrológica da propriedade;
 Grupo B, inaptos na avaliação andrológica da propriedade;
 Comparação entre os dois grupos e os três estádios: $\chi^2=7,88$; 2 GL; P=0,02.
 Comparação entre a, b: $\chi^2=1,66$; 1 GL; P=0,20.

**.Quantifying the expression of TGF α (*transforming growth factor alpha*)
in germinative cells and S100 proteins in Sertoli cells, in bulls of synthetic
breed with deficient seminal quality**

Marilise M. Horn¹, José C. F. Moraes² and Maria I. A. Edelweiss³

¹PhD Candidate in the Graduate Program in Veterinary Science, Veterinary School, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS and ²Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS and ³Department of Pathology, Medical School, Federal University of Rio Grande do Sul.

The transforming growth factor alpha (TGF α) is a molecule from the family of the growth factors and has been calling attention as a probable regulator of testicular development. The hypotheses in the present study was that bulls from synthetic breeds with deficient seminal quality presented different TGF α expression and average number of Sertoli cells when compared to normal bulls. Testicles from six Braford and eight Brangus-Ibagé bulls sound and unsound for reproduction were used. The immunohistochemical technique was employed to determine the TGF α expression in seminiferous epithelium and the nucleus of the Sertoli cells with the use of the S100 protein polyclonal antibody. The general average of spermatogonia marked by the antibody was different for each breed, being it 9.2 ± 0.4 for Braford and 11.0 ± 0.3 for Brangus-Ibagé. No difference regarding the expression of TGF α was found among sound and unsound bulls. The average number of Sertoli cells was similar between phases and bull breeds. A smaller cell population was found in the sound Brangus-Ibagé bulls, which may be an indication that the origin of the low seminal quality in synthetic bulls should be detached from the embryonic or the early newborn phase when the total number of such cells in adults is established. The understanding of cell interaction in the seminiferous epithelium, involving growth related factors, requires not only the identification of the expression site but also the *in vivo* meaning to spermiogenesis. The study of the growth factors in the testicle in adult bulls is worth further research in order to understand the regulation of spermiogenesis at the paracrine level in adult animals.

Introduction

The observation that there are animals with semen quality alterations, kept under the same environmental and handling conditions than others in normal reproductive standards motivates the development of research work in the field of animal andrology. From the genotype point of view it has been found that crossbred bulls, the so called “synthetic bulls”, show a higher rate of culling due to semen quality alterations than pure breed bulls raised in the same environmental conditions (Moraes et al., 1998; Chacón et al., 1999; Horn et al. 2002).

In general, reproductive functions in males are regulated in three levels: the broadest involving FSH, inhibina, LH and testosterone; the intermediate level involving the seminiferous epithelium and growth factors; and the local level with the interaction for Sertoli cells, germinative and peritubular cells, as well as Leydig cells and macrophages. Growth related factors are intercellular-signaling molecules that play an important role in the autocrine-paracrine control of spermatogenesis (Levine et al., 2000), regulating the expression of genes (Kloos et al., 2002). The proliferating cell population in the testis is the potential goal for spotting the presence and the function of growth factors (Skinner et al., 1991). The deficiency of the epidermal growth factor (EGF), a factor that is structurally similar to the transforming growth factor α (TGF α), is largely produced in submandibular glands, and sialodenectomized rats show a higher number of primary spermatocytes than controls, indicating a blockage of the meiosis upon the lack of EGF (Tsutsumi et al., 1986). On the other hand, the super expression of this factor also causes meiosis deficiency (Wong et al., 2000). The expression of eight growth factors, among them the TGF α and the EGF, has also been detected in deer testicles in different seasons (Wagener et al., 2000). Although endocrinous regulation is important to make sure that reproductive processes are synchronized with physiological events in puberty, environmental conditions, seasons of the year and nutrition, it becomes growingly evident that there is a paracrine/autocrine control that modulates cell interactions within the testicle (Gnessi et al., 1997).

The Sertoli cell population is defined in the end of pregnancy or just after delivery (Clermont and Perey, 1957; Steinberger and Steinberger, 1971) being it a fixed sized

population after puberty and directly related to the germinative population of cells (Orth et al., 1988). Sertoli cells produce essential factors to the maturation of germinative *in vitro* cells, increasing the synthesis of RNA and DNA (Rivarola et al., 1985). Alterations such as the regression of the seminiferous tubules with altered-looking Sertoli cells and the reduction in the number of germinative cells are characteristics of atrophied testicles found in old animals and are due to the loss of interacting abilities among Sertoli and germinative cells (Syed and Hecht, 2002). According to Russel et al. (1983) one single Sertoli cell may be in contact with five others adjacent Sertoli cells and 47 germinative cells in various development stages, which accounts for their complex physiology and importance in peculiar spermatogenic cell interactions (Skinner, 1991). Since they synthesized numberless factors, Sertoli cells are immunoreactive to vimentin proteins, cytokeratin and antimüllerian hormone (Steger et al., 1996).

The hypothesis under testing in the present paper was that synthetic breed bulls, with poor seminal quality, would show a TGF α expression and number of Sertoli cells that were different from normal bulls.

The aim was to find out what the TGF α expression is like in the seminiferous epithelium of adult bulls with altered and normal seminal quality as well as of the average Sertoli cell population present in the seminiferous tubules in the different phases in reproduction among sound and unsound bulls.

Animals and Methods

Animals:

The testicles of six two-year-old Braford and eight Brangus-Ibagé bulls, coming from two properties in the South of Rio Grande do Sul, were used. The animals were previously classified on farm for their quality semen and were considered sound and unsound according to the recommendations of the Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Brazilian College for Animal Reproduction) (1998). The bulls were slaughtered in cold storage plants, the bulls that had good semen quality but not zootechnically desirable, were selected for this study and were considered sound for reproduction. The bulls with bad

semen quality were considered unsound for reproduction. Right after slaughtering, samples were collected from one of each animal's testicle, placed in Bouin fixer for 24 hours and processed by standard histological methods.

Immunohistochemistry:

The sections (4 μ m thickness) were placed on slides that had been given previous treatment with running water and immersion in a watery solution of 15% of casein gum. The cuts were dewaxed and rehydrated in decreasing concentrations of alcohol. Antigen retrieval was carried out by microwaving the sections in citrate buffer (pH 6,0), at maximal power for 10 min. The blockage of endogenous peroxidase was done through bathing in 5% hydrogen peroxide aqueous solutions. The blockage of unspecific reactions was achieved by dipping the slides in fat free milk at 5% in PBS.

Two primary antibodies were used in two different studies: the monoclonal TGF α (Ab-2; Oncogenic Research Products, Cambridge, USA) and the polyclonal S100 protein (DAKO), at dilutions of 1:20 and 1:300, respectively, for paraffin-embedded sections. Positive controls of the TGF α and the S100 were respectively human skin and neuronal tissue. Negative controls were the same testicle cut but without the primary antibody. The primary antibody was then put in after having been left in a dark-humid chamber at 4 °C over night. After this period, the secondary antibody (LSAB, DAKO) was put in the dark-humid chamber for 30 minutes. Reaction development was achieved by using a substrate solution of diaminobenzidine (Kit DAB, DAKO). Slides were counter stained with Mayer's Hematoxiline solution for 20 seconds.

Analysis:

The histological analysis of the spermatogenic cycle was carried out based on original suggestion for bovines (Amann, 1962), according to which the spermatogenic cycle was divided into eight stages, according to the morphology of the spermatids. The classification proposed in the present study includes the grouping of some determined phases allowing for the combined assessment of stages of the spermatid cycle that present the same principal features. New stage I has its major event in the mitosis of spermatogonia in pre-leptotene and spermatocyte leptotene and round shaped or slightly extended spermatids (stages I and II as in Amann, 1962). The new stage II is the meiotic stage, when reductional cell divisions occur and cells become young spermatids out of spermatocytes

(stages III and IV as in Amann, 1962). The new stage III represents the maturation phase in which transformations from spermatids into spermatozoa take place (stages V to VIII as in Amann, 1962).

Five hundred twenty-eight cross sections were observed in order to identify and quantify those spermatogonia that were immunoreactive to the TGF α antibody, and the respective phase of each seminiferous tubule. And 440 tubules were observed so as to quantify the nucleus of Sertoli cells that were marked by using the S100 antibody, and the respective phase of each seminiferous tubule. The diameter of the tubules was measured with a millimeter ruler to the microscope. Diameters ranged from 0,2–0,9mm.

The number of spermatogonia marked by the TGF α and the number of Sertoli cell nucleus identified by the S100 was submitted to the ANOVA test, considering breed, reproductive condition (sound and unsound bulls) and spermatogenic stage of the cycle, adjusted to average diameter tubules (co-variable). The analysis was carried out by means of the application of the statistic package NCSS 6.0 (Hintze, 1996).

Results

The expression of the TGF α in the spermatogonia within the seminiferous epithelium and in the cytoplasm of the Sertoli cell was identified. The general average number of spermatogonia marked by the antibody was different ($P<0.05$) for each breed, being it 9.2 ± 0.4 for Braford and 11.0 ± 0.3 for Brangus-Ibagé. No difference regarding the expression of TGF α was found among sound and unsound bulls. As for Braford, the average of sound and unsound bulls was 9.4 ± 0.7 and 8.9 ± 0.5 , respectively and for Brangus-Ibagé, 11.1 ± 0.6 and 11.0 ± 0.4 .

A difference ($P<0.05$) in the average of TGF α overexpressing spermatogonia in the different stages of the spermatogenic cycle was identified. Stages I, II and III showed averages 12.4 ± 0.5 ; 7.0 ± 0.5 e 10.9 ± 0.4 , respectively.

Still regarding the stages, a significant interaction between breeds and stages as shown in Figure 1. was observed.

The using of the S100 antibody was useful for marking the nucleus and cytoplasm of the Sertoli cells and for making the counting of these cells in the different tubules in sound and unsound bulls easier. No differences were found between Braford and Brangus-Ibagé breeds (15.9 ± 0.3 and 15.6 ± 0.3 respectively), and for the sound and unsound animals (15.6 ± 0.3 and 16.0 ± 0.2 , respectively). However, there was significant interaction between breeds and reproductive conditions (Figure 2).

Description of immunohistochemical findings:

The marking of the $TGF\alpha$, inside the seminiferous tubules, became clearly defined in the spermatogonia (Figure 3). It was also possible to mark $TGF\alpha$ in the cytoplasm of the Sertoli cells, more remarkably in those tubules that presented degeneration (Figure 4). The S100 marked the nucleus and cytoplasm of the Sertoli cells, distinguishing them from other cells belonging to the basis of the seminiferous tubule of the epithelium (Figure 5).

Discussion

The identification of the $TGF\alpha$ in the testis has already been described in rats (Skinner et al., 1991; Levine et al., 2000; Petersen et al., 2001), mice (Tajima et al., 1995), deer (Wagener et al., 2000) and humans (Nakazumi et al., 1996). However, studies neither have aimed at the identification of bovines nor of adult animals classified according to potential fertility.

The present study shows that in the bulls confirms the description for other species, demonstrating that the $TGF\alpha$ is present in the bovine testicle and that the cells that express this factor are the spermatogonia. It was found that the stages that most overexpress the $TGF\alpha$ were stages I and III, and that the least expressing stage was number II where meiosis take place. Such outcome is in accordance with the general classification into three phases of the spermatogenic cycle, being the $TGF\alpha$ more frequently present in the proliferation and maturation phases in adult bulls. Going back to Wong et al. (2000), concerning the fact that the proliferating cell population is the potential target to identify the expression of growth factors.

The significant difference found between breeds proves that the Braford breed shows a lower average of $TGF\alpha$ expressing spermatogonia as compared to the Brangus-Ibagé breed. According to previous studies on the classification of seminal quality, it was demonstrated that Braford presents a higher culling rate due to poor seminal quality than Brangus-Ibagé (Moraes et al., 1998). A lower expression of growth factors in the testicle, observed in this study, could be the reason for poor semen quality since these factors are key molecules that affect cell proliferation, meiosis and differentiation, besides their action on the control of spermatogenesis (Wagener et al., 2000; Roser, 2001).

The interaction observed between breeds and stages as shown in Figure 1, suggests at a differential expression of the $TGF\alpha$ in the three phases for each genetic bull group. The Brangus-Ibagé bulls show higher averages of $TGF\alpha$ expressions in stage I, and the Braford in stage III. These differences indicate that the phases in the spermatogenic cycle, where spermatogonial proliferations with $TGF\alpha$ expressions concentrate, was different among the genotypes of bulls. Such result suggests that others growth factors or cytokines may be expressed differently in distinct genetic groups of animals.

There is a positive correlation between the total number of Sertoli cells and the population of germinative cells in the adult phase (Orth et al., 1988; Skinner, 1991; Tajima et al., 1995; Foresta, et al., 2001; Syed and Hecht, 2002). In the present paper, the average number of spermatogonia in the proliferative phase could not be directly compared to the average number of Sertoli cells because the counting of both cell populations, despite the fact that sections were made in series, has not been done with a double immunohistochemical marking. Sertoli cell counting in the different phases of the spermatogenic cycle has not been different in reproduction sound and unsound bulls. Nevertheless, Figure 2 demonstrates the interaction between breed and reproductive condition, being the average of Sertoli cells for sound and unsound Braford bulls similar, and higher for unsound Brangus-Ibagé bulls. Sertoli cells are unable to multiply in the adult phase. The divisions takes place just before or after delivery, that is, before the first spermatogenic wave, and the dividing of these cells is regulated by two factors, the FSH and opiates peptides of testicular nature (Orth, 1986). Orth et al. (1988) found that in rats, with a Sertoli cell population decreased by drug administration right after birth, there was a reduction in the percentage of round spermatids, which could be the reflex of a reduction in

the recruiting of spermatogonia or a degeneration of germinative cells. On the other hand, in humans, although in most cases of idiopathic infertility the population of germinative cells is directly related to that of Sertoli cells, certain types of deletions in the Y chromosome, although bringing about severe damage to the seminiferous tubule, do not alter the function of the Sertoli cells, assessed by the concentration of Inhibina B in the serum of patients (Foresta et al., 2001). Even though considering the little difference ($P < 0,05$) for the Brangus-Ibagé breed only, the alteration related to the low seminal quality in unsound bulls shall possibly be detached from the pregnancy or after-birth phase, when the multiplication and the definition of the number of Sertoli cells in the adult male occur (Clermont and Perey, 1957; Steinberger and Steinberger, 1971; Skinner, 1991).

Regarding detailed immunohistochemical findings, Figure 3 shows that among germinative cells, only the spermatogonia expressed $TGF\alpha$. Cells in the pre-leptotene phase in the meiotic prophase, no longer express the factor. Figure 4 demonstrates the expression of $TGF\alpha$ in the cytoplasm of Sertoli cells, more remarkably in the degenerated tubules. These findings are in accordance with those of Nakazumi et al. (1996), which found a higher $TGF\alpha$ expression in the cytoplasm of Sertoli cells in human patients with spermatogenic disturbances. Such fact could be either related to a compensatory effect in the expression of $TGF\alpha$ or the inappropriate inhibition of the factor due to general disarrangement of the seminiferous epithelium. Figure 5 shows the marking of the S100 in Sertoli cells. Such marking becomes interesting to the study of Sertoli cells since these cells feature a quite varied and complex morphology (Russel et al., 1983). S100 proteins also regulate intracellular processes such as the cell cycle, transcription and differentiation, and are discharged by cells that carry out extracellular activities with paracrine effects. The genes of the S100 were identified in the human chromosome 1q21, in which chromosomal abnormalities resulting from an alteration in the expression of these genes, are associated to cardiomiopathies, neurodegenerative disorders and cancer (Heizmann et al., 2002). In the present study it was found that Sertoli cells overexpress the S100 protein. The relevance of this observation deserves a more detail study, searching for the inter-relation with the normal function of the seminiferous epithelium.

This study has also spotted the expression of the $TGF\alpha$ in spermatogonia in the different phases of the spermatogenic cycle, and differences of expressions among breeds.

Understanding cell interactions in the seminiferous epithelium, involving growth factors, requires not only the identification of expression sites but also the action and the *in vivo* meaning in spermatogenesis. Further studies on cell inter-relations in the seminiferous epithelium in adult bulls with abnormal spermatogenesis may contribute to the understanding of spermatogenesis at the paracrine level in adult animals.

Acknowledgements

The authors are grateful to Flávia Giusti and Neiva Copetti for technical assistance in preparing the immunohistochemistry, to Dr. Carlos Jaume and Dr. Carlos Galina for helpful suggestions, to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq for a post-graduate scholarship to the first author and to the MCT-PRONEX program, for financial support.

References

- Amann RP** (1962) Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis *The American Journal of Anatomy* **110** 49-67
- Chacón JC, Müller E, Söderquist L and Rodriguez-Martínez H** (1999) Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica *Theriogenology* **52** 221-231
- Clermont Y and Perey B** (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats *American Journal of Anatomy* **100** 241-267
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal** (1998) Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal 2ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- Foresta C, Bettella A, Moro E, Roverato A, Merico M and Ferlin A** (2001) Sertoli cell function in infertile patients with and without microdeletions of the azoospermi factors on the y chromosome long arm *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86** 2414-2419

- Gnessi L, Fabbri A and Spera G** (1997) Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment *Endocrine Rev.* **18** 541-609
- Heizmann CW, Fritz G and Schafer BW** (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology *Frontiers in Bioscience* **7** 1356-1368
- Hintze JL** (1996) NCSS 6.0. User's guide. Kaysville, Utah, 2204 p.
- Horn MM, Moraes JCF and Maciel MN** (2002) Variação estacional da qualidade seminal em touros de genótipo puro europeu e sintético derivado *Rev. Bras. Reprod. Animal* in press
- Kloos DU, Choi C and Wingender E** (2002) The TGF- β Smad network: introducing bioinformatic tools *Trends in Genetics* **18** 96-103
- Levine E, Cupp AS, Miyashiro L and Skinner MK** (2000) Role of transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development *Biology of Reproduction* **62** 477-490
- Moraes JCF, Horn MM and Rosado A** (1998) Avaliação andrológica em touros: Qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais *Ciência Rural* **28** 647- 652
- Nakazumi H, Sasano H, Maehara I and Orikasa S** (1996) Transforming growth factor- α , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human testis obtained from biopsy and castration: immunohistochemical study *Tohoku J. Exp. Med.* **178** 381-388
- Orth J** (1986) FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by β -endorphin produced in the testis *Endocrinology* **119** 1876
- Orth JM, Gunsalus GL and Lamperti AA** (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development *Endocrinology* **122** 787-794
- Petersen C, Boitani C, Fröysa B and Söder O** (2001) Transforming growth factor- α stimulates proliferation of rat Sertoli cells *Molecular and Cellular Endocrinology* **181** 221-227
- Rivarola M, Sanchez P and Saez J** (1985) Stimulation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis in spermatogenic cells by their coculture with Sertoli cells *Endocrinology* **117** 1796

- Roser JF** (2001) Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions *Animal Reproduction Science* **68** 139-151
- Russel LD, Tallon-Doran M, Weber JE, Wong V and Peterson RN** (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. III. A study of specific cellular relationships *American Journal of Anatomy* 167 181
- Skinner MK** (1991) Cell-cell interactions in the testis *Endocrine Reviews* **12** 45-77
- Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G and Bergmann M** (1996) Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study *International Journal of Andrology* **19** 122-128
- Steinberger A and Steinberger E** (1971) Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo in organ culture *Biology of Reproduction* **4** 84-87
- Syed V and Hecht NB** (2002) Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects *Molecular and Cellular Endocrinology* **186** 155-157
- Tajima Y, Watanabe D, Koshimizu U, Matsuzawa T and Nishimune Y** (1995) Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes *International Journal of Andrology* **18** 8-12
- Tsutsumi O, Kurachi H and Oka T** (1986) A physiological role of epidermal growth factor in male reproduction function *Science* **233** 975-977
- Wagener A, Blottner S, Göritz F and Fickel J** (2000) Detection of growth factors in the testis of roe deer (*Capreolus capreolus*) *Animal Reproduction Science* **64** 65-75
- Wong RW, Kwan RW, Mak PH and Mak KK** (2000) Expression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice *Journal of Biological Chemistry* **275** 18297-18302

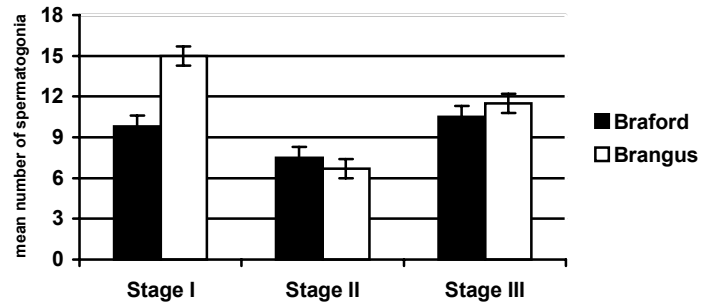


Figure 1- Average number of spermatogonia expressing TGF α in three stages of the spermatogenic cycle in the two synthetic breeds ($P < 0.05$).

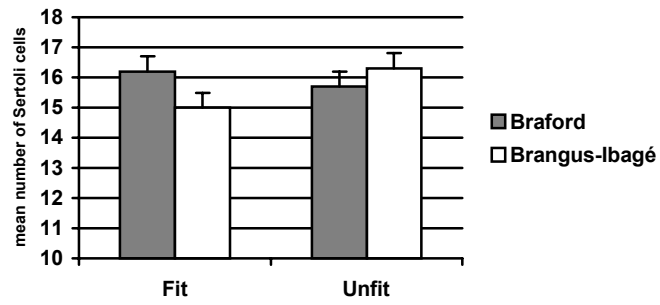


Figure 2- Frequency of Sertoli cells in the two reproduction sound and unsound bull breeds ($P < 0.05$).

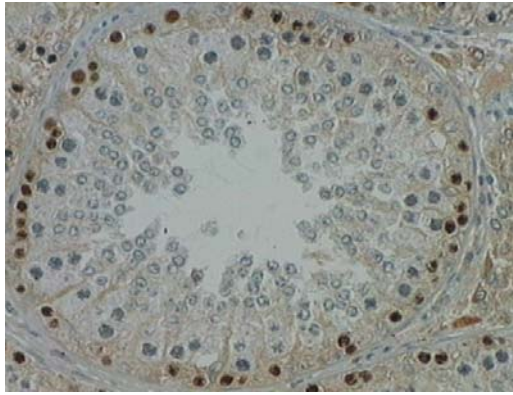


Figure 3- spermatogonia expressing TGF α
(200x)

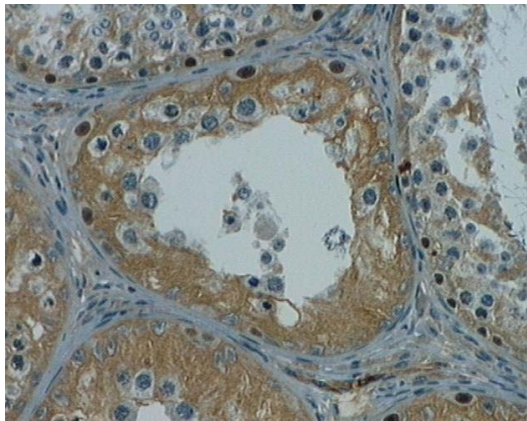


Figure 4- TGF α in degenerated seminiferous
tubule (200x)

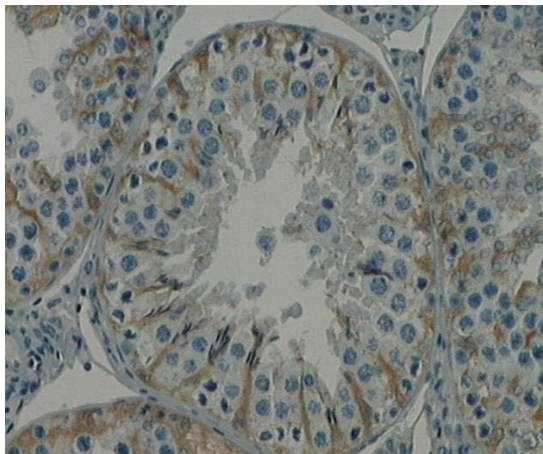


Figure 5- expression of S100 protein in Sertoli cells

CAPÍTULO 7

Discussão geral

Os experimentos desenvolvidos buscaram informações sobre como funcionam alguns aspectos da espermatogênese em touros considerados inaptos à reprodução, por deficiente qualidade seminal, em raças sintéticas. A fertilidade dos reprodutores bovinos é um fator essencial para assegurar o sucesso nos sistemas de criação pecuário. Os lotes de animais em geral são preparados para que cada touro seja capaz de emprenhar no mínimo 40 vacas em um período de 90 dias, sendo evidente a importância do macho no retorno econômico do sistema pecuário. Considerando que o valor de comercialização de cada touro em média equivale a três novilhos, um percentual de descarte de touros de 30 a 40%, após o exame andrológico, poderá inviabilizar economicamente a produção. O maior percentual de descarte nos touros de determinadas raças sintéticas foi o motivo principal desta tese, que explorou a função reprodutiva destes animais através de cinco abordagens que investigaram o sistema reprodutivo destes animais.

O **experimento I** demonstrou que os touros da raça Braford, considerados inaptos à reprodução no início do período experimental, mantiveram o quadro espermático alterado por seis meses, e ainda os considerados aptos também ao longo do tempo passaram para inaptos em função de alterações na qualidade do sêmen. Considerando que os animais foram avaliados durante o inverno, onde as pastagens estavam com baixa disponibilidade e qualidade, mesmo assim todas as características seminais dos touros da raça sintética foram de qualidade inferior aos touros da raça pura, testados nas mesmas condições ambientais. Este resultado está de acordo a hipótese de Horn et al. (1999) de que os touros do grupo sintético são mais sensíveis as condições ambientais do que os puros, e por isto mantêm-se por mais tempo com alterações no quadro espermático. A importância dos resultados destas análises andrológicas subseqüentes, é que na rotina de um sistema pecuário este procedimento se torna antieconômico de ser realizado, uma vez que seria necessário manter por vários meses um número expressivo de touros, com qualidade de sêmen alterada, para ser verificada a evolução do quadro espermático.

Comprovado experimentalmente que touros Braford com a qualidade do sêmen alterada não apresentam recuperação desta condição em um período de seis meses, ou seja,

na prática são eliminados como reprodutores potenciais após serem submetidos a duas ou três análises andrológicas, com intervalos aproximados de 30 dias, o **experimento II** tratou de buscar informações sobre a morfologia do cromossomo Y e sua relação com a fertilidade e ainda com os tipos de cruzamentos realizados nas raças Braford e Brangus-Ibagé. A diferença morfológica do Y entre as duas subespécies de bovinos, deve-se a uma inversão pericêntrica, ocorrida no ancestral comum que supõe-se que era portador de um cariótipo com 60 cromossomos acrocêntricos (Kieffer & Cartwright, 1968).

Em um estudo preliminar com 16 touros Brangus, escolhidos ao acaso, Pinheiro et al. (1979) observaram que nove apresentavam Y submetacêntrico e sete acrocêntrico. Estes animais não apresentaram relação do tipo morfológico de cromossomo Y com características fenotípicas (conformação de prepúcio, escroto e testículo) e com características seminais (morfologia, motilidade e vigor espermático). No **experimento II**, apesar de serem analisados 792 touros, a relação entre a morfologia do cromossomo Y e a condição reprodutiva não foi observada nas duas raças, Braford e Brangus-Ibagé. Segundo Pinheiro et al. (1980) o único cromossomo diferente no cariótipo das duas subespécies de bovinos, o cromossomo sexual Y, apresenta o mesmo material genético, pois o padrão de bandas cromossômicas evidencia uma identidade entre todos os cromossomos, levando a crer que as diferenças entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, são essencialmente gênicas. Certamente o ordenado processo da espermatogênese requer um preciso e bem coordenado programa que regula as constantes alterações no padrão de expressão gênica (Diemer & Desjardins, 1999). Ainda permanece por ser esclarecido se desordens na espermatogênese podem ser o resultado de um simples defeito de um gene candidato ou se é necessária a extinção da informação genética de uma região inteira (Vogt, 1998). Estes argumentos de certa maneira contrariam a hipótese formulada por Halnan (1989), que a simples morfologia do cromossomo Y poderia ser utilizada como marcador racial e como modelo genético para explicar as menores taxas reprodutivas dos touros originados de cruzamentos com Brahman.

Um total de 32% dos casos de infertilidade masculina em humanos é idiopática (Nieschlag, 1997). No entanto atualmente com estudos baseados na análise molecular do genoma humano, já é permitida a classificação de algumas desordens na espermatogênese antes inexplicadas (Diemer & Desjardins, 1999). As microdeleções no braço longo do

cromossomo Y, são identificadas em pacientes humanos com azospermia e oligospermia (Foresta et al. 2001). Estes são casos que ocorrem em baixos índices na população. No caso dos bovinos com alterações de qualidade seminal, não se pode descartar, antes de ser investigado, que deleções genéticas possam estar ocorrendo e sendo mantidas na população, em função dos cruzamentos fechados e de biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial.

Os tipos de cruzamentos realizados para obtenção dos 3/8 Nelore na raça Braford foram avaliados separadamente dos demais tipos de cruzamentos, e foi observado que determinadas maneiras de se obter a proporção de 3/8 apresentavam diferenças significativas nas taxas de descarte. Como na raça Braford são aceitos todos os graus de sangue para fins de registro, existe uma maior variedade de tipos de cruzamentos e graus de sangue quando se compara por exemplo com a raça Brangus. Estes tipos de cruzamentos que apresentaram diferenças no percentual de touros inaptos à reprodução na raça Braford, não foram realizadas nos indivíduos Brangus avaliados, já que a grande maioria dos cruzamentos destes últimos touros são feitos com base em 3/8 x 3/8, e uma pequena parcela originada de um tipo de cruzamento que utiliza macho Aberdeen Angus em fêmeas 3/4 Nelore. Este fato reforça o resultado de que o tipo de cruzamento que origina conjunto haplóide Nelore com cromossomo Y acrocêntrico está relacionado com o percentual de descarte por alterações seminais, já que os touros Brangus, além de não apresentarem este tipo de cruzamento, têm taxas de descarte dentro do limite considerado normal de 10-20% encontrado na literatura (Johnson et al. 1995; Bruner et al. 1995; Gottschall & Mattos 1997).

Após ser analisada a questão dos cruzamentos, foi analisada a possibilidade de seleção diferencial de espermatozóides anômalos ao longo do epidídimo. Este mecanismo foi amplamente investigado por Roussel et al. (1967), Martan (1969) e Rao (1980), em diferentes espécies incluindo os bovinos *Bos taurus taurus*. O **experimento III** tratou de avaliar a ocorrência desta seleção em touros de uma raça sintética, com e sem alterações na qualidade seminal. Foi observado que, os 12 touros Braford que vieram classificados da propriedade quanto a aptidão reprodutiva em dois aptos e 10 inaptos, ao serem avaliados quanto ao percentual de defeitos espermáticos na cauda do epidídimo, foram reclassificados em dois aptos, quatro inaptos e seis com percentual de defeitos espermáticos menor do que

30%. Isto indicou que, ou estes 6 animais estavam em um estágio de regeneração do quadro espermático, considerando que do exame ao abate transcorreram de 15 a 30 dias; ou o protocolo de análise andrológica utilizado nestes animais é extremamente exigente (e cabe aqui considerar o que está sendo avaliado como anomalia espermática, como pequenas alterações de tamanho de cabeça); ou inclui outras causas de descarte além da morfologia espermática. Este resultado é intrigante no sentido de que se levantam questões sobre a real importância de determinadas características espermáticas, que constam nos protocolos de análise andrológica, sobre a fertilidade, e a flexibilização dos limites destes parâmetros através da avaliação do indivíduo como um todo, dando ênfase a características reprodutivas compensatórias (Moraes et al. 1998). Também a veracidade da reclassificação, em grupos A, B e C, foi confirmada pelo comportamento da gota citoplasmática proximal que foi diferente entre os três grupos de touros ao longo do epidídimo. Observa-se que o comportamento da gota citoplasmática é sensível o suficiente para separar aqueles touros com sérias alterações testiculares, das alterações moderadas e dos normais. De uma maneira geral os resultados deste experimento contradizem os do **experimento I** onde os touros da raça sintética não apresentaram recuperação do quadro espermático em seis meses, sendo que no **experimento III**, dos 10 touros classificados como inaptos na propriedade de origem, apenas quatro mantiveram a condição de inapto e seis apresentavam uma possível “melhora” do quadro espermático, de acordo com o percentual de anormalidades na cauda do epidídimo e comportamento da gota citoplasmática proximal ao longo do epidídimo. Compilando os resultados dos dois **experimentos I e III**, se resume que um percentual dos touros considerados inaptos à reprodução apresenta esta condição em estado permanente, e seriam estes os portadores da anomalia que se busca esclarecer.

O **experimento IV** buscou investigar qual a frequência dos estádios do ciclo espermatogênico e quais destes estádios estariam relacionadas aos touros aptos e inaptos à reprodução. Este experimento foi realizado nas duas raças sintéticas, Braford e Brangus, e foi observado que o estágio das meiose é mais frequente nos touros inaptos das duas raças, o que indica um bloqueio nesta fase do ciclo, nos touros com alterações na qualidade seminal. No entanto, para os touros Braford também o estágio III, o estágio da maturação espermática, apresentou diferenças entre touros aptos e inaptos, com maior frequência para os touros aptos. Os resultados das análises dos touros Braford são bastante coerentes, uma

vez que a diferença no estágio II é compensada no estágio III. Este experimento indicou que bloqueios nas fases meióticas aconteceram com maior frequência nos touros inaptos das duas raças, Braford e Brangus. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos que mostram que a expressão de alguns genes é específica de determinados estágios da espermatogênese (Eddy, 2002). Os genes envolvidos no controle dos ciclos mitóticos e meióticos da diferenciação celular nos mamíferos estão apenas agora sendo identificados. Eles incluem um complexo arranjo de quinases, fosfatases, proteínas regulatórias, e também de substratos, incluindo componentes das estruturas nucleares e citoplasmáticas envolvidos na divisão celular (Wolgemuth et al. 2002).

Assim como o **experimento III** foi capaz de confirmar que a classificação de touros quanto o potencial reprodutivo através de análise do ejaculado ou de amostra retirada da cauda do epidídimo é refletido em diferenças ao longo do epidídimo, o **experimento IV** confirma que a classificação dos touros em aptos e inaptos perante amostra de sêmen está relacionado também com a frequência de estágios do ciclo espermatogênico. Com estes resultados se pode inferir que a expressão dos genes que atuam no controle do ciclo meiótico (Liu et al 1998) podem estar envolvidos no processo que leva a alterações na qualidade de sêmen. Estas diferenças no ciclo aparecem em ambas raças sintéticas após a fase proliferativa, ou seja antes das meiose não é possível, através de histologia, classificar os touros quanto a aptidão reprodutiva.

A regulação endócrina em nível parácrino/autócrino no testículo, pelas células que em contato interagem entre si (Skinner, 1991), é outro importante ponto de estudo para descobertas sobre a origem de determinados problemas na espermatogênese. É bem conhecido o papel fundamental das células de Sertoli na espermatogênese, proporcionando sustentação, nutrição e amadurecimento às células germinativas. A estrutura colunar e convoluta destas células, que se estendem desde a membrana basal até a superfície apical do túbulo, proporciona suporte físico para as espermatogônias entrem em mitose, os espermatócitos em meiose e as espermátides passem por todo o processo de espermiogênese até se transformarem em espermatozóides. As células de Sertoli produzem uma série de proteínas como as inibinas A e B, que são capazes de suprimir a liberação de FSH *in vivo* e *in vitro*, além de exercerem um controle local inibindo mitoses espermatogoniais (Van Dissel-Emiliani et al., 1989). Existem também as transferrinas, que

captam ferro através da barreira hemato-testicular e liberam para as células germinativas, para serem utilizados na respiração celular. Os receptores de transferrina estão presentes em todas as células e altas concentrações destes receptores são encontrados em espermátócitos paquítenos (Holmes et al., 1983). Alterações nas associações celulares do testículo provocadas por calor (Jegou et al. 1984), irradiação (Pineau et al., 1989; Legue et al., 2001), agentes citotóxicos (Gaytan et al 1994) e envelhecimento (Syed & Hecht, 2002), sugerem que existem interações regulatórias entre as células de Sertoli e as células germinativas.

A frequência das células de Sertoli é um dado representativo, considerando a importância destas células no desenvolvimento da espermatogênese. Como estas células têm sua proliferação durante a fase tardia da gestação e logo após o nascimento (Clermont & Perey, 1957), é óbvio que se algum distúrbio afetar as células de Sertoli durante a fase crítica de intensa multiplicação, provavelmente o número final destas células e a produção espermática estarão reduzidos no animal adulto. No **experimento V**, ao ser analisada a frequência de células de Sertoli nos animais das raças Braford e Brangus, não foram observadas diferenças entre os animais aptos e inaptos. Isto sugere que para o tipo de alteração espermática em questão, a frequência final das células de Sertoli não foi importante. No entanto o **experimento V** apenas observou a presença física das células de Sertoli e não a funcionalidade delas, que poderia ser medida através da identificação da produção de inibina B (Anderson et al., 1998), ou transferrina (Sylvester & Griswold, 1994), ou de Interleucinas 1 e 6 (Stephan et al. 1997; Legue et al 2001; Mahmoud & Lunenfeld, 2002).

Muitos fatores de crescimento, membros da super família de peptídeos *transforming growth factor beta* (TGF β) são identificados no testículo na fase pós natal e são candidatos a reguladores dos eventos da puberdade e da espermatogênese (Mullaney & Skinner, 1993), assim como também estão presentes nas células da granulosa exercendo uma regulação parácrina sobre o desenvolvimento folicular (Souza et al., 2002). O **experimento V** avaliou diferenças entre os touros aptos e inaptos com relação a expressão de um dos fatores presentes no testículo, o *transforming growth factor alpha* (TGF α). Como este tipo de abordagem, ainda não foi explorada em bovinos, foi verificado primeiramente neste estudo, que o TGF α é expressado nas espermatogônias e no citoplasma das células de Sertoli. Este

resultados estão coerentes com o descrito por Skinner et al., (1989) que o TGF α é produzido pelas células de Sertoli e atua promovendo a síntese de DNA e a proliferação das células germinativas. No entanto não foram encontradas diferenças entre a frequência de espermatogônias marcadas e a classificação dos touros em aptos e inaptos. Este resultado também está de acordo com os resultados das frequências de células de Sertoli, que não foram diferentes entre touros aptos e inaptos à reprodução, considerando que as células de Sertoli são as possíveis fontes deste fator. A diferença encontrada foi entre raças, sendo a raça Brangus a que apresentou maior média. O fato dos touros Brangus apresentarem maior frequência de expressão de TGF α , talvez esteja relacionado com as menores taxas de descarte destes animais quando comparados com os touros Braford, apresentados no **experimento II**. Nos estádios I e no III ocorreu a maior frequência de expressão de TGF α , coincidindo com os momentos do ciclo espermático em que mais se encontram espermatogônias. Este resultado está de acordo com Garcia & Russell (2001), que encontraram que as espermatogônias formadas a partir das células tronco, têm suas divisões sincronizadas e definidas, ocorrendo em estádios específicos do ciclo do epitélio seminífero. O **experimento V** iniciou um tipo de abordagem de estudo, que pode ser continuado através de análises de proteínas, citocinas e fatores de crescimento testiculares, que contribuem para o entendimento do controle parácrino/autócrino da espermatogênese, e possivelmente estejam relacionados às alterações reprodutivas.

Conclusões gerais

- ✓ Um percentual da população de touros da raça Braford apresentou uma alteração em nível espermatogênico permanente. É possível, porém, que o padrão de análise andrológica em touros de raças sintéticas deva ser revisto, no sentido de se buscar uma avaliação andrológica individualizada, evitando que o extremo ajuste aos protocolos estabelecidos traga prejuízo ao sistema pecuário.

- ✓ As inter-relações entre os tipos de cruzamentos realizados na obtenção de animais 3/8 Nelore, e o percentual de animais aptos à reprodução merece ser avaliado em profundidade. Até o presente momento foi observado que animais 3/8, derivados de fêmeas 1/4 Nelore e machos 1/2 de pai Nelore, apresentaram maiores índices de

alterações espermáticas, provavelmente devido a formação de indivíduos com conjunto haplóide Nelore e cromossomo Y acrocêntrico. Destes resultados surge a indicação prática da não utilização do tipo de cruzamento que utiliza fêmeas $\frac{1}{4}$ com machos $\frac{1}{2}$, ou machos $\frac{1}{4}$ de pai Nelore.

- ✓ O estudo da seleção de anomalias espermáticas ao longo do epidídimo, em touros de uma raça sintética, mostrou que a gota citoplasmática proximal é um indicador sensível às alterações na espermatogênese.
- ✓ O ciclo do epitélio seminífero apresentou diferenças na sua frequência dos estádios da fase meiótica em touros aptos e inaptos à reprodução, indicando um bloqueio nesta fase para aqueles animais com alterações na qualidade seminal.
- ✓ A expressão do TGF α no epitélio seminífero foi diferente nas duas raças sintéticas de touros, sendo maior na raça cujo percentual de descarte à reprodução está dentro dos limites considerados normais.
- ✓ O estudo do controle parácrino/autócrino da espermatogênese, através das análises de proteínas e citocinas testiculares, pode servir para o entendimento das alterações na espermatogênese em outras espécies incluindo a humana.
- ✓ Em todos experimentos em que as raças Braford e Brangus-Ibagé foram confrontadas, os resultados obtidos foram diferentes. As maiores frequências de alterações na qualidade seminal não podem ser extrapoladas para todas as raças sintéticas, cabendo a prerrogativa para cada raça de um estudo específico e ajustado às condições ambientais.

BIBLIOGRAFIA CITADA

AMANN, R.P. Evaluation of sperm quality: can we pick the winners? In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995, Anais: Belo Horizonte, 1995, p.206-212.

ANDERSON, R.A.; IRVINE, D.S.; BALFOUR, C.; GROOME, N.P.; RILEY, S.C. Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. **Human Reproduction**, v.13, p.920-926, 1998.

ASBIA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Disponível em <<http://asbia.com.br>>. Acesso em 10 set. 2002.

BABU, R.K.; RAO, A.R. Evaluation of crossbred bulls for breeding soundness. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v.12, p.111-113, 1991.

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

BASUR, P.K.; MOON, Y.S. Chromosomes of cattle, bison and their hybrid, the cattalo. **American Journal of Veterinary Research**, v.28, p.1319, 1967.

BLOCKEY, M.A.B. Serving capacity- A measure of the serving efficiency of bulls during pasture mating. **Theriogenology**, v.6, n.4, p.393-398, 1976a.

BLOCKEY, M.A.B. Sexual behavior of bulls at pastures. A review. **Theriogenology**, v.4, p.387-392, 1976b.

BLOM, E. Interpretation of spermiogram in bulls. **Fertility & Sterility**, v.1, n.3, p.23-35, 1950

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects in a proposal for a new classification of the bull spermiogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25, p.383-391, 1973.

BOVINOS- Disponível em <<http://www.bovinos.npg.ig.com.br>>. Acesso em 10 set. 2002.

BRANGUS- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BRANGUS. Disponível em <<http://www.brangus.com.br>>. Acesso em 10 set. 2002.

BRUNER, K. A., MCCRAW, R.L., WHITACRE, M.D., VAN-CAMP, S.D. Breeding soundness examination of 1,952 yearling beef bulls in North Carolina. **Theriogenology**, v.44, p.129-145, 1995.

CARROLL, E.J.; BALL, L.; SCOTT, J.A. Breeding soundness in bulls- a summary of 10,940 examinations. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.42, p.1105-1111, 1963.

CHACÓN, J.C. MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v.52, p.221-231, 1999a.

CHACÓN, J.C. MÜLLER, E.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Morphological features of the seminiferous and cauda epididymides epithelia of breeding Zebu bulls with normal and decreased testicular consistency. **Journal of Reproduction and development**, v.45, p.119-128, 1999b.

CHACÓN, J.C. Assessment of sperm morphology in Zebu bulls under fields conditions in the tropics. **Reproduction Domestic Animal**, v.36, p.91-99, 2001.

CHENOWETH, P.J.; OSBORNE, H.G. Breed differences in the reproductive function of young beef bulls in central Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.405-406, 1975.

CHENOWETH, P.J.; CHASE JR, C.C; LARSEN, R.E.; THATCHER, M.J.D.; BIVENS, J.F.; WILCOX, C.J. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. **Applied Animal Behaviour Science**, v.48, n.3-4, p.225-236, july, 1996.

CHENOWETH, P.J. Bull libido/serving capacity. **Veterinary Clinics of North American Food Animal Practicy**, v.13, n.2, p.331-344, 1997.

CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy**, v.100, p.241-267, 1957.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.

CONEXÃO DELTAG- Disponível em <<http://www.deltag.com.br>>. Acesso em 10 set. 2002.

COSTA e SILVA, E.V.; FONSECA, V.O.; HERMANNY, A.; LANA RIOS, C.M.; BARBEITOS, R. Avaliação Andrológica de Touros Nelore e Aptidão Reprodutiva: Taxa de Gestação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.17, p.97-109, 1993.

COULTER, G.H.; KOZUB, G.C. Efficacy of methods used to tet fertility of beef bulls used for multiple-sire breeding under range conditions. **Journal of Animal Science**, v.67, p.1757-166, 1989.

COULTER, G.H.; ROUNSAVILLE, T.R.; FOOTE, R.H. Heretability of testicular size and consistency in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v.43, p.9-12, 1976.

CRUDELLI, G.A.; FONSECA, V.O.; COSTA E SILVA, E.V. Aptidão Reprodutiva de Touros de Raça Nelore. Efeito das Características Seminais e Circunferência Escrotal Sobre a Fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, p.33-39, 1992.

CUDICINI, C.; LEJEUNE, H.; GOMEZ, E.; BOSMANS, E.; BALLEST, F.; SAEZ, J.; JEGOU, B. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and 6. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, n.5, p.1426-1433, MAY, 1997.

CUNNINGHAM, E.P.; SYRDTAD, O. Crossbreeding *Bos indicus* and *Bos taurus* for milk production in the tropics. Roma: FAO, 1987, p.90.

DIEMER, T.; DESJARDINS, C. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. **Human Reproduction Update**, v.5, n.2, p.120-140, 1999.

DUGAST, I.; JEGOU, B. Cytokines and interactions Sertoli cell germ-cells. **Contraception Fertilite Sexualite**, v.22, n.10, p. 631-634, Oct., 1994.

EDDY, E.M. Male germ cell gene expression. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, p.103-128, 2002.

EL-DEMIRY, M.I.; HARGREAVE, T.B.; BUSUTTIL, A.; ELTON, R.; JAMES, K.; CHISHOLM, G.D. Immunocompetent cells in human testis in health and diseases. **Fertility & Sterility**, v.48, p.470-479, 1987.

EUCLIDES FILHO, K. Melhoramento genético e os cruzamentos em bovinos de corte. Documento reimpresso em Campo grande, MS, 1997.
www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc./doc63

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: imprensa Universitária, 1981, p.279.

FERNANDEZ, L.T.V.; GARCIA, R.G. Can routine semen analysis by itself really predict potencial fertility of bulls? **Revista Científica- Facultad de Ciencias Veterinárias**, v.12, n.3, p.202-208, 2002.

FITZPATRICK, L.A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M.R.; BERTRAM, J.D.; DOOGAN, V.J.; De FAVERI, J.; MILLER, R.G.; HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.39-49, 2002.

FONSECA, V.O.; CRUDELI, G.A.; COSTA E SILVA, E.V.; HERMANNY, A. Aptidão reprodutiva de touros da raça nelore. efeito das diferentes estações do ano sobre as características seminais circunferência escrotal e fertilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.1, p.7-15, 1992.

FOOTE, R.H.; HAHN, J.; LARSON, L.L. Testicular measurements as predictors of sperm out put and semen quality. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION ANO REPRODUCTION, 3., Chicago, 1970. Proceedings... s.1., NAAB, 1970. p.31-5.

FORDYCE, G.; FITZPATRICK, L.A.; COOPER, N.J.; DOOGAN, V.J.; De FAVERI, J.; HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia 5. Social behaviour and management. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.81-99, 2002.

FORESTA, C.; BETTELA, A.; FERLIN, A. Evidence for a stimulatory role of follicle-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males. **Fertility & Sterility**, v.69, p.636-642, 1998.

GARCIA, H.C.; RUSSEL, L.D. High-resolution microscopic characterization of mouse spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1170-1178, 2001.

GAYTAN, F.; BELLIDO, C.; MORALES, C.; GARCIA, M.; VAN ROOIJEN, N.; AGUILAR, E. In vivo manipulation (depletion versus activation) of testicular macrophages: central and local effects. **Journal of Endocrinology**, v.150, p.57-65, 1996.

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review of cattle reproduction in the tropics . Part 6. The Male. **Animal Breeding Abstracts**, v.59, n.5, p.403-412, 1991.

GALLOWAY, D.B. Fatores que afetam a fertilidade bovina. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1979. p.209-56. (Traduções 007-008-009/79).

GALLOWAY, D.B. Reproductive physiology of the male. In: ANDROLOGY, Sixth Course Technical Management of Artificial Insemination. Sweden: SIPAR- Swedish Internacional Program on Animal Reproduction, 1994. Cap.12.

GERARD, N.; SYED, V.; BARDIN, C.W.; GENETET, N.; JEGOU, B. Sertoli cells are the site of interleucin-1 α synthesis in rat testis. **Molecular Cell Endocrinology**, v.82, p.13-16, 1991.

GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. **Endocrine Reviews**, v.18, p.541-609, 1997.

GOTTSCHALL, G.S.; MATTOS, R.RC. Achados de exames andrológicos em touros de corte Bos taurus e Bos indicus. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.25-28; 1997.

GUTIERREZ, C.; GALINA, C.S.; RUBIO, I. The Influence of the Social Structure of a Zebu Herd on the Manifestation of Signs of Oestrus. **World Animal Review of Animal Production**, v.28, p.58-69, 1993.

HALE, D.W.; WASHBURN, L.L.; EICHER, E.M. Meiotic abnormalities in hybrid mice of the C57BL/6J x Mus spretus cross suggest a cytogenetic basis for Haldane's rule of hybrid sterility. **Cytogenetics and Cell Genetic**, v.63, n.4, p.221-234, 1993.

HALES, D.B.; DIEMER, T.; HALES, K.H. Role of cytokines intesticular function. **Endocrine**, v.10, n.3, p.201-217, 1999.

HALNAN, C.R.E. **Cytogenetics of Animals**. C.A.B. Internacional, 1ª edição, p.519, 1989.

HAMMERSTEDT, R.H. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. **Animal of Reproduction Science**, v.42, p.77-87, 1996.

HIGDON, H.L.; SPITZER, J.C.; HOPKINS, F.M.; BRIDGES, W.C. Jr. Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. **Theriogenology**. v.53, n.6, p.1321-1332, 2000.

HOLMES, S.D.; BUCCI, L.R.; LIPSHULTZ, L.I.; SMITH, R.G. Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. **Endocrinology**, v.113, p.1916, 1983.

HORN, M.M., MORAES, J.C.F.; GALINA, C.S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé frente á degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p.523-526, 1999.

HORN, M.M.; MORAES, J.C.F; MACIEL, M. Variação temporal na qualidade do sêmen de touros de genótipo puro europeu e sintético derivado. Aceito para publicação na Revista Brasileira de Reprodução Animal.

HUANG, H.F.S.; MARSHALL, G.R.; ROSENBERG, R.; NIESCHLAG, E. Restoration of spermatogenesis by righ levels of testosterone in hypophysectomized rats after long-term regression. **Acta Endocrinologica** v.116, p.433-444, 1987.

JEGOU, B.; LAWS, A.O. DE KRETZER, D.M. Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat: further evidence for interaction of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells. **International Journal of Andrology**, v7, p.244, 1984.

JOHNSON, W.H., THOMPSON, J.A., KUMI-DIAKA, J., WILTON, J.W., MANDELL, I.B. The determination and correlation of reproductive parameters of performance-tested Hereford and Simmental bulls. **Theriogenology**, v.44, p.973-982, 1995.

JOLY, D.; BAZIN, C.; ZENG, L.W.; SINGH, R.S. Genetics basis of sperm and testis lenth differences and epistatic effect on hybrid inviability and sperm motility between *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. **Heredity**, v.78, n.4, p.354-362, 1997.

KAKU, Y.; KON, Y.; TAKAGI, N.; YAMASHITA, T.; HAYASHI, M. WATANABE, T. Histological analysis of male hybrid sterility induced by the Hst-1 gene in mice. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.57, n.5, p.973-975, 1995.

KHAN, S.A.; SODER, O.; SYED, V.; GUSTAFSSON, K.; LINDH, M.; RITZEN, E.M. The rat testis produces large amounts of an interleukin-1 like factor. **International Journal of Andrology**, v.10, p.494-503, 1987.

KHAN, S.A.; SCHMIDT, K.; HALLIN, P.; DI PAULI, R.; DE GEYTER, C.H.; NIESCHLAG, E. Human testis cytosol and ovarian follicular fluid contain high amounts of interleucin-1-like factor(s). **Molecular Cell Endocrinology**, v.58, p.221-230, 1988.

KIEFFER, N.M., CARTWRIGHT, T.C. Sex Chromosome polymorphism in domestic cattle. **Journal of Heredity**, v.59, p.35-37, 1968.

LAMNISSOU, K.; LOUKAS, M.; ZOUROS, E. Incompatibilities between Y chromosome and autosomes are responsible for male hybrid sterility in crosses between *Drosophila virilis* and *Drosophila texana*. **Heredity**, v.76, n.6, p.603-609, 1996.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J.; CHENOWETH, P.J.; BERNDTSON, W.E. Assessing sex-drive in young *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.151-160, 2001.

LAGERLÖF, N. Morphologische untersuchungen über veränderungen im spermabild und in den hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilität. Acta Path. Microbiolog Scan, suppl 19, Tese, Stockholm, 1934.

LARSON, L. Physical examination of the reproductive system of the bull. In: MARROW, D.A. Current therapy in theriogenology. Philadelphia, W.8. Saunders, 1980. p.307-330.

LEGUÉ, F.; GUITTON, N.; BROUAZIN-JOUSSEAUME, V.; COLLEU-DUREL, S.; NOURGALIEVA, K.; CHENAL, C. IL-6 a key cytokine in in vitro and in vivo response of Sertoli cells to external gamma irradiation. **Cytokine**, v.16, n.6, p.232-238, 2001.

LIU, D.; MATZUK, M.M.; SUNG, W.K.; GUO, Q.; WANG, P.; WOLGEMUTH, D.J. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. **Nature Genet.**, v.20, p.377-380, 1998.

MADALENA, F.E.; TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy cattle in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1887-1901, 1990.

MADRID, N.; OTT, R.S.; RAO, D.N.V.; PARRET, D.F.; VANDERWERT, W.; WILLMS, C.L. Scrotal circumference, seminal characteristics and testicular lesions of Angus bulls. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.4, p.579-585, 1988.

MAHMOUD, H.; LUNENFELD, E. Involvement of intratesticular IL-1 in the regulation of Sertoli cell function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.187, p.125-132, 2002.

MAK, V; JARVI, K.A. The genetics of male infertility. **Journal of Urology**, v.156, p.1245-1257, 1996.

MARTAN, J. Epididymal histochemistry and physiology. **Biology of Reproduction**, suplemento I, p.134-154, 1969.

McCOOL, C.J. Spermatogenesis in Bali cattle (*Bos sondaicus*) and hybrids with *Bos indicus* and *Bos taurus*. **Research in Veterinary Science**, v.48, n.3, p.288-294; 1990.

McDOWELL, R.E.; WILK, J.C.; TALBOTT, C.W. Economic viability of crosses of *Bos taurus* and *Bos indicus* for dairying in warm climates. **Journal of Dairy Sciences**, v.79, p.1292-1203, 1996.

McGOWAN, M.R.; BERTRAM, J.D.; FORDYCE, G.; FITZPATRICK, L.A.; MILLER, R.G.; JAYAWARDHANA, G.A.; DOOGAN, V.J.; De FAVERI, J.; HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia . 1-Physical traits. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.25-37, 2002.

MEINHARDT, A.; BACHER, M.; METZ, C.; BUCALA, R.; WREFORD, N.; LAN, H.; ATKINS, R.; HEDGER, M. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: Examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. **Biology of Reproduction**, v.59, n.2, p.371-378, AUG, 1998.

MOLINA, R.; GALINA, C.S.; CAMACHO, J.; MAQUIVAR, M.; DIAZ, G.S.; ESTRADA, S.; MARTÍNEZ, L. Effect of alternating bulls as a management tool to improve the reproductive performance of suckled Zebu cows in the humid tropics of Costa Rica. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.152-173, 2002.

MORAES, J.C.F. Predição da fertilidade de touros empregados em monta natural. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.287.

MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO, A. Avaliação andrológica em touros: Qualidade dos Indicadores da Aptidão reprodutiva em Distintos Grupos Raciais. **Ciência Rural**, v.28, p.647-652, 1998.

MOSER, D.W.; BERTRAND, J.K.; BENYSHEK, L.L.; McCANN, M.A.; KISER, T.E. Effects of selection for scrotal circumference in Limousin bulls on reproductive and growth traits of progeny. **Journal of Animal Science**, v.74, n.9, p.2052-2057, 1996.

MULLANEY, B.P.; SKINNER, M.K. Transforming growth factor-beta (beta-1, beta-2, and beta-3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. **Molecular Endocrinology**, v.7, p.67-76, 1993.

MÜLLER, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BRADEN, S.; EDQVIST, L.E. Testicular ultrastructure of Zebu bulls in Costa Rica. **Journal of Veterinary Medicine**, v.39, p.382-391, 1992.

NEVILLE, W.J.; GRAHAN, E.F.; BOWER, R.E. Relationship of bovine semen quality to fertility. **Journal of Dairy Science**, v.54, n.5, p.787, 1971.

NIESCHLAG, E. Classification of andrological disorders. In: Nieschlag, E. & Behre, H. (eds). **Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction**. Springer-Verlag, Berlin, p.81-83, 1997.

PINEAU, C.; VELEZ DE LA CALLE, J.F.; PINON-LATAILLADE, G.; JEGOU, B. Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation: further evidence for an influence of late spermatids on Sertoli cell function in the adult rat. **Endocrinology**, v.124, p.2720, 1989.

ORIHUELA, T.A.; GALINA, C.S.; DUCHATEAU, A. Behavioural Patters of Zebu Bulls Towards Cows Previously Synchronized with prostaglandin F2a. **Applied Animal Behavioral Science**, v.21, p.267-276, 1988.

OSBORNE, H.G.; WILLEANS, L.G.; GALLOWAY, D.B. A test for libido and serving ability in beef bulls. **Australian Veterinary Journal**, v.47, p.467-77, 1971.

PICCINALI, R.; GALINA, C.S.; NAVARRO-FIERRO, R. Behavioural patterns of zebu bulls towards females synchronised with PGF2 α or oestrogens under corral and field conditions. **Applied Animal Behavior Science**, v.35, n.2, p.125-133, 1992.

PINEDA, N.; LEMOS, P.F.; FONSECA, V.O. Comparação entre dois testes de avaliação do comportamento sexual (libido) de touros Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.4, p.29-34, 1997.

PINHEIRO, L.E.L, MIES FILHO, A., MORAES, J.C.F., VAN HOOGSTRANTEN, M.I.M.J. Avaliação andrológica de touros com polimorfismo cromossômico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, p.23-26, 1979.

PINHEIRO, L.E.L; MORAES, J.C.F.; MATTEVI, M.S.; ERDTMANN, B.; SALZANO, F.M.; MIES FILHO, A. Two types of Y chromosome in a brazilian cattle breed. **Caryologia**, v.33, n.1, p.25-32, 1980.

PÖLLÄNEN, P.; MADDOCKS, S. Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.437-445, 1988.

- RAO, R A.; BANE, A. GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v.14, p.1-12, 1980.
- RODRIGUEZ, C.; GALINA, C.S.; GUTIERREZ, C.; NAVARRO, R.; PICCINALLI, R. Evaluacion de la Actividad Sexual de los Toros Cebu Bajo Condiciones de Empadre Multiple con Hembras Sincronizadas con PGF2a. **Ciencias Veterinárias**, San José, v.15, p.41-49, 1993.
- RONCOLETTA, M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozoides e plasma seminal relacionadas com a congelabilidade de sêmen de touros. 1999, 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- ROSER, J.F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.139-151, 2001.
- ROUSSEL, J.D.; STALLCUP, O.T.; AUSTIN, C.R. Selective phagocytosis of spermatozoa in the epididymis of bulls, rabbits and monkeys. **Fertility & Sterility**, v.18, p.509-516, 1967.
- SAACKE, R.G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON AI AND ANIMAL REPRODUCTION, 3., 1970, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1970, p.17-30.
- SAACKE, R.G.; WHITE, J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON AI AND ANIMAL REPRODUCTION, 4., 1972, **Proceedings...**, National Association of Animal Breeders, 1972, p.22-27.
- SAIRAM, M.R.; KRISHNAMURTHY, H. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from Knockout animal models. **Arch Med. Res.**, Canadá, v.32, n.6, p.601-608, 2001.
- SALVADOR, D.F.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; SILVA, A.S.; NOGUEIRA, E. Perfil andrológico de touros da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.2, p.64-67, 2002.
- SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **Eur. J. Endocrinol.** V.137, p.107-117, 1997.
- SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.; PORTO, J.A. Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh x Nelore e Chianina x Nelore: características espermáticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.10, p.1745-1760, 1991.

SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.N.; UNANIAM, M.M. Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções anormalidades e outros fatores que a influenciam. Versão digital do documento 51 publicado em Campo Grande, MS 1993. localizado no site www.cnpqc.embrapa.br/publicações/doc.doc51, dia 21/08/2002.

SKINNER, M.K.; TAKACS, K.; COFFEY, R.J. Cellular localization of transforming growth factor-alpha gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. **Endocrinology**, v.124, p.845, 1989.

SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**, v.12, p.45-77, 1991.

SNOOK, R.R. Sperm production and sterility in hybrids between two subspecies of *Drosophila pseudoobscura*. **Evolution**, v.52, n.1, p.266-269, 1998.

SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; McNEILLY, A.S.; BAIRD, D.T. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. **Reproduction**, v.123, p.363-369, 2002.

SOUZA, M.; CREMADES, N.; ALVES, C.; SILVA, J.; BARROS, A. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. **Human Reproduction**, v.17, n.1, p.161-172, 2002.

STEPHAN, J.P.; SYED, V.; JEGOU, B. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.134, n.2, nov., p.109-118, 1997.

SULLIVAN, J.J. Sperm numbers required for optimum breeding efficiency in cattle. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 3., Chicago, 1970. Proceedings... s.l., NAAB, 1970. p.36-43.

SYED, V.; SÖDER, O.; ARVER, S.; LINDH, M.; RITZÉN, E.M. Ontogeny and cellular origin of na IL-1 like factor in the reproductive tract of male rats. **Internacional Journal of Andrology**, v.11, p.437-447, 1988.

SYED, V.; GERARD, N.; KAIPIA, A.; WAYNE BARDIN, C.; PARVINEN, M. Identification, ontogeny, and regulation of an interleucin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. **Endocrinology**, v.132, n.1, p.293-299, 1993.

SYED, V.; HECHT, N.B. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.186, p.155-157, 2002.

SYLVESTER, S.R.; GRISWOLD, M.D. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. **Journal of Andrology** v.15, p.381-385, 1994.

TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S. Sistema de cruzamento como alternativa para o melhoramento de bovinos. In: XXXVI REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999, Porto Alegre. **Anais**. p.127-141.

TSUTSUMI, O.; KURACHI, H.; OKA, T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproduction function. **Science**, v.233, p.975-977, 1986.

VALE-FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; MENDONÇA, R.M.A.; BERGMANN, J.A.G.; REIS, S.R. Características do sêmen e classificação andrológica por pontos (CAP) de touros Nelore de 2, 3 e 4 anos de idade, criados exclusivamente a pasto, na região de Unaí, MG. In: **Enc. Pesq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v.14, 1994, p.83.

VALE-FILHO, V.R.; BERGMANN, J.A.G.; ANDRADE, V.J.; QUIRINO, C.R.; REIS, S.R.; MENDONÇA, R.M.A. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.42-44, 1997.

VAN DEMARK, N.L. & MANGER, R.E. Effect of energy intake on reproductive performance of dairy bulls. II. Semen production and replenishment. **Journal of Dairy Science**, v.47; n.8, p.898-904, 1964.

VAN DISSEL-EMILIANI, F.M.; GROOTENHUIS, A.J.; DE JONG, F.H.; DE ROOIJ, D.G. Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and Chinese hamsters. **Endocrinology**, v.125, p.1898-1903, 1989.

VOGT, P.H. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.739-744, 1998.

WAGENER, A; BLOTTNER, S.; GÖRITZ, F.; FICKEL, J. Detection of growth factors in the testis of roe deer (*Capreolus capreolus*). **Animal Reproduction Science**, v.64, n.1-2, p.65-75, 2000.

WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, 24(3):761-5, 1965.

WILTBANK, J.N.; PARISH, N.R. Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected for semen quality. **Theriogenology**, v.25, p.779-783, 1986.

WOLGEMUTH, D.J.; LAURION, E.; LELE, K.M. Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, p.57-101, 2002.

RESUMO

O motivo deste estudo foi o percentual elevado de descarte de touros por alterações reprodutivas, precisamente qualidade de sêmen, que se apresenta em determinados sistemas produtivos nos quais estão inseridas as raças sintéticas. Através de cinco experimentos foi permitido observar o comportamento da espermatogênese de touros de raças sintéticas do nível cromossômico ao funcional do epitélio seminífero. O experimento I, avaliou por seis meses as características seminais de 12 touros, seis de uma raça pura e seis de uma sintética, contendo em cada grupo touros aptos e inaptos a reprodução classificados por qualidade de sêmen. Os animais do grupo sintético não apresentaram recuperação das características seminais durante o período de avaliação, como os puros, indicando um quadro degenerativo permanente neste conjunto de indivíduos.

O experimento II buscou identificar uma relação entre a morfologia do cromossomo Y e tipos de cruzamentos, com a qualidade seminal de touros de duas raças sintéticas, Braford e Brangus-Ibagé. A relação da morfologia do Y com a condição reprodutiva não foi comprovada, no entanto considerando os tipos de cruzamentos para obtenção de touros $3/8$, os cruzamentos que utilizam fêmea $1/4$ com macho $1/2$ sangue filho de Nelore proporcionam um maior percentual de animais considerados inaptos ao exame de sêmen. Este experimento sugere medidas práticas para evitar o cruzamento que traz maiores prejuízos econômicos.

O experimento III foi proposto para avaliar a intensidade de redução de células espermáticas anômalas ao longo do epidídimo em touros de uma raça sintética. A redução da frequência de gota citoplasmática proximal foi distinta entre os grupos de touros classificados quanto a morfologia espermática e entre as regiões do epidídimo, sendo portanto um indicador sensível da qualidade espermática e classificação da fertilidade potencial de animais de raças híbridas.

O experimento IV avaliou a frequência dos túbulos seminíferos nos diferentes estádios do ciclo espermatogênico em touros de duas raças sintéticas. Nas fases iniciais do ciclo espermatogênico, todos os touros apresentam gametogênese semelhante. Nas fases em que ocorrem as divisões meióticas, os touros inaptos apresentaram maior frequência e a na fase de maturação das espermátides os touros aptos apresentaram maior frequência. Estes

resultados indicam que nos touros inaptos ocorre um bloqueio na fase das meioses, diminuindo a frequência dos estádios de maturação das espermátides.

O experimento V identificou a expressão diferencial de um fator de crescimento (transforming growth factor alpha- $TGF\alpha$) no epitélio seminífero de touros Braford e Brangus-Ibagé, aptos e inaptos à reprodução, e também avaliou a frequência de células de Sertoli nestes animais, como um estudo inicial do controle parácrino da espermatogênese. A maior frequência da expressão de $TGF\alpha$ foi observada nos estádios I e III, e também na raça Brangus-Ibagé. O número médio das células de Sertoli foi semelhante entre estádios e raças dos touros.

Em todos experimentos em que as raças Braford e Brangus-Ibagé foram confrontadas, os resultados obtidos foram diferentes. As maiores frequências de alterações na qualidade seminal não podem ser extrapoladas para todas as raças sintéticas, cabendo a prerrogativa para cada raça de um estudo específico e ajustado às suas condições de criação.

ABSTRACT

The observation that there are animals with semen quality alterations, kept under the same environmental and handling conditions as others in normal reproductive features motivates the development of research work in the field of animal reproduction. By means of five study methodologies the behavior of the spermatogenesis in bulls of synthetic breed was observed, ranging from the chromosome to the functional level of the seminiferous epithelium.

Experiment I has evaluated the seminal characteristics of bulls belonging to a pure breed and to a synthetic breed. This longitudinal study has observed that there is a permanent testicular degenerative process among the group of individuals belonging to the synthetic breed. Experiment II has demonstrated no direct association between the individual type of Y chromosome and reproductive soundness, previously estimated through andrological examination. However, in the Braford breed, when 1/4 Nelore females and 1/2 bulls with father Nelore are used to produce 3/8 bulls, there is a greater percentage of culled bulls due to reproductive problems.

Experiment III indicates that bulls with altered spermatogenesis do not have the same capacity of reduce abnormal sperm forms along the epididymis as those bulls considered to have normal spermatogenesis. The dynamics of the frequency of the proximal cytoplasmatic droplet can be a sensitive indicator of spermatic quality. Experiment IV has indicated that spermatogenesis progresses adequately in stage I in synthetic bulls with abnormalt semen quality. During the meiotic and spermatid maturation period, disturbs in the spermatogenesis of the unsound bulls have occurred. Experiment V identified the overexpression of transforming growth factor alpha ($TGF\alpha$) in seminiferous epithelium of bulls that were sound and unsound for reproduction, and has also evaluated the frequency of Sertoli cells in these animals as an initial study of the paracrinous control of spermatogenesis.

In all the experiments in which the Braford and Brangus-Ibagé breed were compared the results obtained were different. The highest frequencies of poor semen quality cannot be extrapolated to all synthetic breeds and a specific study for each breed needs to be adjusted to the different environmental conditions.