

Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

**SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE NO
DESENVOLVIMENTO PONDERAL E SEXUAL EM
BUBALINOS MACHOS NO PERÍODO PERIPUBERAL**

ARIEL DE ALMEIDA COELHO

Chapadinha – MA
Março – 2014

ARIEL DE ALMEIDA COELHO

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE NO
DESENVOLVIMENTO PONDERAL E SEXUAL EM
BUBALINOS MACHOS NO PERÍODO PERIPUBERAL

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior

Chapadinha – MA
Março - 2014

Coelho, Ariel de Almeida

Somatotropina bovina recombinante no desenvolvimento ponderal e sexual em bubalinos machos no período peripuberal / Ariel de Almeida Coelho – Chapadinha, 2014.

66f.

Orientador: Profº Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior

Dissertação (Mestrando em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Maranhão, 2014.

1. Somatotropina 2. Sêmen 3. Igf-I. 4. Búfalo I. Título

ARIEL DE ALMEIDA COELHO

**SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE NO
DESENVOLVIMENTO PONDERAL E SEXUAL EM
BUBALINOS MACHOS NO PERÍODO PERIPUBERAL**

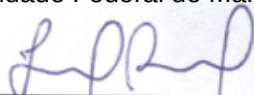
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação Aprovada Em: 20/03/2014

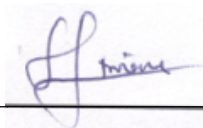
BANCA EXAMINADORA



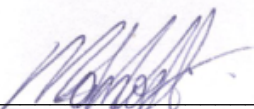
Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão



1º Examinador (Prof. Dr. Henrique Nunes Parente)
Universidade Federal do Maranhão



2º Examinador (Prof. Dra Lindsay Unno Gimenes)
Universidade Estadual Paulista



3º Examinador (Dr. Manoel Francisco de Sá Filho)
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e força para permitir que pudesse realizar mais esta etapa de minha vida;

Aos meus pais, Antonio José Coelho de Sousa e Claudia Maria Sousa de Almeida Coelho, responsáveis por todo o caminho percorrido até aqui, pelos ensinamentos, incentivo nos momentos difíceis, confiança e amor incondicional;

Ao meu orientador José Ribamar de Souza Torres Júnior, cuja orientação foi fundamental para esta conquista, pela oportunidade, paciência, dedicação e contribuição para meu aprendizado e profissionalismo;

Aos amigos do Grupo de Reprodução Animal, Itamara França, Aline Saldanha, João Vinicius, Hélyda Gomes, Carol Gomes, Celso, Sonia Lima Eduardo, Thaiane, Diego que me fizeram conhecer o verdadeiro sentido da palavra “equipe”;

Aos amigos da “República dos Codó” e de Chapadinha, João Vinicius, Marcio Vinicius, Mauro Nunes, Saullo Chagas, Augusto Esposito, Lucas Fernandes, William Diniz, Francisco Loiola, Karina Coelho e Bruna Martins por me acolherem e por suas amizades;

A Fazenda Agropecuária Boca do Cercado pela cessão dos animais e das instalações necessárias ao desenvolvimento desse trabalho;

A Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e o PPGCA pela oportunidade da realização desta pós-graduação;

Aos professores Ricardo Chaves e Fernando Andrade da Universidade Estadual do Maranhão pela atenção e ajuda durante esta pesquisa e ao professor Guilherme de Paula Nogueira da UNESP de Araçatuba pela colaboração nas dosagens hormonais.

Aos meus irmãos, primos e amigos que me apoiaram e sempre acreditaram em mim;

A FAPEMA pela concessão da bolsa de estudo;
Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Puberdade em bubalinos.....	15
3.1.1. Puberdade e a espermatogênese	17
3.2. Maturidade sexual.....	18
3.4. Fator de crescimento semelhante à insulina	21
3.5. O eixo somatotrópico e a reprodução.....	23
3.6. Somatotropina recombinante bovina Faltou dados científicos	24
HIPÓTESE	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Animais experimentais e manejo zootécnico	26
4.2. Delineamento experimental.....	27
4.2.1. Desenvolvimento ponderal e biometria testicular.....	28
4.2.2. Avaliação seminal.....	29
4.2. 3. Determinação das concentrações de IGF-1	31
4.3. Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Desenvolvimento ponderal e testicular.....	32
5.2. Características físicas e morfológicas do ejaculado.....	38
5.3. Concentrações de Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I)	44
6. DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Peso (linhas contínuas) e escore de condição corporal (linhas tracejadas) em bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

Figura 2. Perímetro escrotal em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST

Figura 3. Comprimento (linhas contínuas) e largura testicular (linhas tracejadas) em bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

Figura 4. Volume testicular (VT cm³) em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Figura 5. Presença de espermatozoides em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Figura 6. Presença de espermatozoides móveis (púbere) em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Figura 7. Motilidade espermática em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Figura 8. Vigor espermático em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Fig. 9. Defeitos espermáticos maiores (linhas contínuas) e menores (linhas tracejadas) em bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

Figura 10. Defeitos de Gota Citoplasmática Proximal (linhas contínuas) e Distal (linhas tracejadas) em espermatozóides de bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

Figura 11. Defeitos de Cabeça em espermatozóides de bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Figura 12. Defeitos de peça intermediária (linhas contínuas) e de peça principal (linhas tracejadas) em espermatozóides de bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

Figura 13. Defeitos Totais de espermatozóides em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Figura 14. Dosagem de IGF1 (ng/mL) de bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

RESUMO

Objetivou-se com este estudo verificar o efeito da somatotropina bovina (bST) sobre o desenvolvimento sexual, características seminais e hormonais em bubalinos no período peripuberal. Um total de 20 búfalos machos, não castrados, da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) (12 meses de idade) foram distribuídos em dois tratamentos (bST vs controle) em um delineamento de blocos ao acaso com dez repetições. O peso corporal, escore de condição corporal, biometria testicular, características seminais e os níveis de IGF-I foram avaliados uma vez por mês durante oito meses. O ejaculado foi coletado por eletroejaculação e submetido a análise física e morfológica. A análise dos dados foi realizada utilizando o Statistical Analysis System for Windows, SAS[®]. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos bST e Controle no peso e no escore de condição corporal. As mensurações testiculares também não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos, mas aumentaram com a idade significativamente em uma tendência similar. Não houve efeito positivo do tratamento com bST sobre a idade ao aparecimento dos primeiros espermatozoides no ejaculado ($P > 0,05$). O bST apresentou uma tendência significativa em antecipar a puberdade ($P = 0,054$). A motilidade, vigor e percentual de anormalidades espermáticas não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre tratamentos. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos bST e Controle nas concentrações séricas de IGF-I. Em conclusão, o uso de bST não resulta em efeitos positivos sobre o desenvolvimento ponderal e sexual em bubalinos machos no período peripuberal.

Palavras-chave: bST, sêmen, IGF-I, bufalo

ABSTRACT

This study aimed to verify the effect of bovine somatotrophin (bST) on sexual development, semen and endocrine traits in peripubertal buffalo. A total of 20 male Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) (14 months of age) were randomly distributed into two treatments (bST vs control). The body weight, body condition score, testicular measurements, semen traits and IGF-I levels were evaluated once a month for a year. The ejaculate was collected by electroejaculation and physical and morphological analyzes were proceeded. Data analysis was performed using the Statistical Analysis System for Windows, SAS[®]. There was no difference ($P>0.05$) between bST and Control treatments on body weight or body condition score. Testicular measurements also showed no differences ($P>0.05$) between treatments, but increases significantly in a similar trend. There was no positive effect of bST treatment on age at first appearance of spermatozoa in the ejaculate ($P>0.05$), but the bST group showed a significant tendency to increase the number of animals exhibiting puberty at each breeding soundness evaluation ($P = 0.054$). Sperm motility, vigor and percentage of abnormalities showed no difference ($P>0.05$). There was no difference ($P>0.05$) between bST and Control treatments on IGF-I serum concentrations. In conclusion, the use of bST did not result in positive effects on sexual development, semen traits and endocrine profile of male buffaloes in peripubertal period.

Key-words: bST, semen, IGF-I, buffalo

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o efetivo de bubalinos é de 1.184.511 cabeças, onde destas, 77. 834 estão localizadas no Maranhão, representando o quarto maior rebanho bubalino brasileiro (IBGE, 2010). Embora ainda pouco difundida, a bubalinocultura está se desenvolvendo no País como uma alternativa rentável e, a introdução de melhorias de manejo aliadas à intensificação do processo seletivo de vacas e touros em alguns rebanhos tem permitido a obtenção de níveis produtivos significativamente mais elevados (TONHATI et al., 2011). A avaliação e melhoria de parâmetros reprodutivos para auxiliarem na seleção de tourinhos se fazem de grande importância para a escolha de futuros reprodutores. Neste contexto, técnicas nas quais se utiliza hormônios sintéticos vêm sendo desenvolvidas na tentativa de melhorar a eficiência produtiva e reprodutiva de animais domésticos.

Ao longo de muitos anos, inúmeros pesquisadores procuram respostas para substâncias atuantes no sistema reprodutivo e tentam compreender todos os fatores relacionados ao complexo mecanismo de regulação endócrina que envolve o hormônio do crescimento (GH), também conhecido como somatotropina. Este hormônio hipofisário regula inúmeros mecanismos do crescimento animal, metabolismo de nutrientes além de interferir nas funções reprodutivas (SOUZA, 2004).

Atualmente este hormônio pode ser utilizado de forma exógena e em escala comercial. Os produtos comerciais disponíveis no mercado são provenientes de moléculas sintéticas de somatotropina, produzidas pela técnica

do DNA recombinante, sendo o produto desta técnica conhecido como somatotropina bovina recombinante (rBST) (CAMPOS, 2008).

Há alguns anos vários trabalhos tem sido delineados com objetivo de estudar os efeitos da rBST sobre o ganho de peso e produção de leite em ruminantes onde, de modo geral, o mecanismo de ação da rBST envolve efeitos agudos no metabolismo de tecidos corpóreos, reduzindo sua competição por nutrientes (HAMMOND, 1952). Ainda, se busca respostas para os efeitos resultantes da aplicação de doses suprafisiológicas de somatotropina no sistema reprodutivo de bubalinos (SOUZA, 2004).

Dentre os hormônios que influenciam os mecanismos reprodutivos, destacam-se também a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), por apresentarem papel primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação (AHIMA et al., 2000; TENA-SEMPERE e BARREIRO, 2002).

O tratamento com rBST aumenta a concentração plasmática de IGF-I cujas principais funções estão relacionadas à qualidade seminal. O IGF-I é um polipeptídio secretado por células mitogênicas principalmente no fígado (SCHAMS et al., 1999; SIROTKIN, 2004) e possui receptores nos testículos, podendo ter grande influência na espermatogênese e esteroidogênese. O IGF-I é o principal mediador da ação do hormônio do crescimento (DUARTE, 2006) e também pode aumentar a secreção de testosterona. Desta forma, o IGF-I circulante pode inicialmente autorregular a produção de testosterona, a qual, em resposta, estimula a secreção de IGF-I e o estabelecimento da retroalimentação positiva entre IGF-I e testosterona secretada nas células de intersticiais testiculares (Leydig) (SOUZA, 2011).

O hormônio do crescimento parece ser essencial à fertilidade, pois tem se mostrado importante regulador de características espermáticas específicas (SOUZA, 2004), como por exemplo a motilidade (HENRICKS et al., 1998).

Assim, contextualizando as pesquisas anteriormente citadas, se espera com a utilização da bST, antecipar o desenvolvimento sexual e a idade à puberdade em bubalinos machos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar o efeito da somatotropina bovina recobinante exógena (rbST) sobre o desenvolvimento ponderal e sexual e hormonal em bubalinos machos no período peripuberal.

2.2 Objetivos específicos

Verificar o efeito da rbST sobre:

- Desenvolvimento ponderal;
- Morfologia/morfometria testicular;
- Características físicas e morfológicas do sêmen;
- Idade à puberdade e/ou maturidade sexual;
- Concentrações sanguíneas de IGF-I;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Puberdade em bubalinos

Na puberdade ocorre o início da expressão do potencial reprodutivo, sendo caracterizada pelo desenvolvimento dos órgãos sexuais e aparecimento das características sexuais secundárias (ANDERSON et al.,1998). No macho a puberdade é definida como o momento em que espermatozóides maduros aparecem no ejaculado em animais jovens. Entretanto este evento não necessariamente coincide com a maturação das funções endócrinas dos testículos (maturação sexual) (GREGORY, 2012).

Assim, a puberdade é o período de vida em que o animal apresenta aumento nas concentrações de testosterona, início da produção de gametas e desprendimento do frênuo peniano. Neste período é possível detectar os primeiros espermatozóides no lúmen do epitélio seminífero, nas caudas dos epidídimos e no ejaculado (GUIMARÃES, 2011).

Segundo Ohashi, Sousa e Vale (1988) a puberdade se estende do início da ativação da gametogênese até seu estabelecimento regular e passa por fases distintas desde o início da presença de espermatozóides no ejaculado até a condição plena de fecundação do sêmen.

Geralmente a puberdade dos búfalos tem início entre os 10 e 14 meses e vai até os 22 a 24 meses, quando atinge a maturidade sexual (VALE et al, 2004). Porém, o que se observa as criações, que em grande maioria são extensivas, é a ocorrência de puberdade e maturidade sexual tardias, sendo que as duas fases normalmente são caracterizadas por apresentarem

mudanças fisiológicas e comportamentais, em que o animal passa a produzir espermatozóides potencialmente férteis e está apto a reproduzir. Nesse período, no qual acontece a diferenciação celular nos testículos, há grande influência da somatotropina (ROCKENBACH, 2009).

No quadro 1, adaptado de AYALA (2011), estão apresentados alguns achados de autores sobre idade à puberdade e à maturidade sexual em bubalinos criados sob diferentes sistemas de criação.

Quadro 1 – Idade à puberdade e maturidade sexual de búfalos da raça Murrah sob diferentes sistemas de manejo.

Autor	Raça	Idade a puberdade	Idade a maturidade	Sistema
Ohashi, Sousa e Vale (1988)	Murrah,	8-9 meses	18 a 24 meses	intensivo
Vale et al. (2002)	Murrah	12 meses	---	intensivo
Ribeiro (2006)	Murrah	< de 15 meses	20 meses	semi-intensivo)
Ribeiro (2006)	Murrah	13 meses	18 meses	intensivo
Ribeiro (2006)	Murrah	24 a 36 meses	---	Extensivo
Barbosa (2007)	Murrah	19 meses	---	Extensivo

3.1.1. Puberdade e a espermatogênese

Ao nascimento, o testículo contém poucas células de Leydig funcionais, enquanto que no lúmen dos túbulos seminíferos se encontram células de sustentação ou células de Sertoli, com a presença de gonócitos que irão dar origem as células de linhagem espermatogênica. Logo após essa fase, o animal entra na fase infantil, até a idade do desmame, entre 6 a 8 meses, quando se inicia gradualmente a secreção de gonadotrofinas pela hipófise (FSH e LH), iniciando-se dessa forma a secreção dos hormônios sexuais masculinos, principalmente a testosterona pelas células intersticiais ou de Leydig, iniciando-se no final desta fase o processo da espermiogênese (SOUZA, 2004).

É no período da puberdade que o complexo, porém organizado, mecanismo da espermatogênese passa a se aperfeiçoar e produzir espermatozóides funcionais, sendo esta, um processo cíclico no qual os gonócitos, primeiras células germinativas a habitarem os túbulos seminíferos, multiplicam-se e diferenciam-se em espermatogônias (GRIFFIN, 1988) que permanecerão inativas até a puberdade, passando por processos de mitose e meiose dando origem às espermátides que vão se diferenciar em espermatozóides.

Melo (1991) afirma que em bubalinos, o período de 10 a 15 meses de idade constitui a fase de transição de pré-puberdade à puberdade no macho, com o peso corporal médio de 290,6 kg com 19,7 de perímetro escrotal médio (BARBOSA, 2009).

Segundo Ohashi (2007) a atividade espermatogênica aumenta de maneira acelerada até 18-24 meses nos bubalinos, com tendência a estabilização, indicando que a partir de 24 meses de idade os animais já estão aptos a iniciar atividade reprodutiva, embora não tenham atingido o seu pleno desenvolvimento testicular/reprodutivo.

Os bubalinos possuem o mais curto ciclo espermatogênico dentre os animais domésticos, com duração de apenas 38 dias (JANAKIRAMAN, 1988). Nos adultos a espermatogênese é um processo contínuo que pode ser dividido em três fases distintas: a mitótica, a meiótica e a espermiogênese, onde cada uma é caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular (BARBOSA, 2009).

Após a fase puberal as mudanças quali-quantitativas da produção espermática ocorrem no sentido de alcançar um platô, onde o potencial reprodutivo de um touro se faz presente. Observaram-se neste período aumento no volume seminal, da motilidade espermática progressiva, do vigor e da concentração espermática total, além do decréscimo de anormalidades espermáticas (NETO et al., 2011).

3.2. Maturidade sexual

A maturidade sexual é alcançada quando o crescimento gonadal e corporal, juntamente com concentrações de testosterona e desenvolvimento sexual, se estabilizam (GUIMARÃES, 2011).

A maioria das pesquisas preconiza a maturidade sexual como a idade em que os animais apresentam-se com características seminais de no mínimo 50% de motilidade espermática progressiva e morfologia espermática com no

máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores (GUIMARÃES, 2011).

Ohashi (1993) afirma que a maturidade sexual em bubalinos seria atingida ao redor dos 24 a 30 meses de idade. Já outro estudo afirma que, embora com 24 meses de idade peso corporal médio de 468,6 kg e 26,2 cm de perímetro escrotal, os animais não tinham atingido a maturidade sexual (MELO, 1991).

4.3. Fatores que influenciam o início da puberdade e maturidade sexual em bubalinos

O momento da puberdade é alterado por numerosos fatores ambientais, externos e internos (AMANN e SCHAMBACHER, 1983; FRENEAU, 2006). Segundo Koonjaenak (2006) ela está relacionada com a idade do animal e fatores ambientais, incluindo a disponibilidade e ingestão de alimentos. Em condições de Brasil, onde maior parte das criações é extensiva o fator de maior impacto na puberdade é a nutrição. Observa-se que animais criados em sistemas intensivos ou semi-intensivos, com manejo alimentar diferenciado têm melhor desenvolvimento corporal e entram em puberdade mais cedo que animais criados em sistemas extensivos onde a oferta de alimentos é de menor qualidade e o animal também sofre mais intensamente a interferência dos fatores climáticos. Assim, a quantidade e a qualidade reduzida dos alimentos durante o período seco do ano modulam o desenvolvimento dos animais

tornando-o mais lento e reduzindo os índices de produtividade atuais

Referências

[P1] Comentário: Não corrigido por Ariel

Vale et al. (2001), sugerem que a maturidade sexual de machos búfalos ocorre com 30-36 meses de idade e com perímetro escrotal superior a 30 cm. O perímetro escrotal ideal para touros da raça Murrah entre 30 e 36 meses de idade está em torno de $30 \pm 3,6$ cm (27 a 33 cm), havendo um crescimento linear e correlacionado entre o perímetro escrotal, o peso corporal e a idade do animal (VALE et al., 2001, 2004, BARBOSA, 2009).

Alguns autores consideram o búfalo como um animal tardio quando comparado ao bovino europeu. Porém outros autores não concordam com esse atributo, preferindo fundamentar o fato dessa espécie apresentar uma eficiência reprodutiva inferior à do bovino europeu e zebuino, no manejo deficiente ou à seleção inadequada a que esta espécie tem sido submetida (HAFEZ, 1954; VALE et al., 1988, 1990, 2001; VALE, 2004).

O peso corpóreo acumulado do animal em relação à idade segue uma curva sigmóide tendo o ponto de inflexão na puberdade. Esta curva é composta por uma fase de pré-puberdade considerada de autoaceleração e outra de pós-puberdade ou de autoinibição (OWENS et al., 1993), sendo que da concepção à puberdade, o crescimento é acelerado e rápido devido ao desenvolvimento dos tecidos ósseo e muscular ativados pela liberação de hormônios proteicos de crescimento (CERVIERI, 2002; SEIXAS, 2006).

3.4. Fator de crescimento semelhante à insulina

Os IGFs (IGF-I e IGF-II) são fatores de crescimento peptídicos que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular. O IGF-I e o IGF-II são moléculas de cadeia única com pesos moleculares de 7.649 e 7.471 daltons, respectivamente, e compartilham resíduos idênticos em 45 posições e 62% de homologia entre si (JONES, 1995; MARTINELLI, 2008).

As duas formas de IGF, IGF-I e IGF-II, guardam grande homologia estrutural com a molécula de insulina, o que permite aos IGFs, além de exercerem suas ações via receptores específicos (receptor tipo I e tipo II), ligarem-se também aos receptores de insulina, que apresentam estrutura semelhante ao receptor tipo-I dos IGFs, ou ainda a receptores híbridos compostos por um hemi-receptor tipo-I e um hemi-receptor de insulina (MARTINELLI et al., 2001). O IGF-II é a forma preponderante na circulação, com concentrações cerca de 3-4 vezes superiores à do IGF-I, mas, distintamente do descrito em relação ao IGF-I, suas concentrações são pouco influenciadas pelo GH (JONES, 1995; MARTINELLI et al., 2001). Além da estrutura, o IGF-I possui funções semelhantes às da insulina tais como, promover aumento da captação de glicose e atividade de síntese proteica (SÁ FILHO, 2006).

Os IGFs são produzidos na maioria dos órgãos e dos tecidos do organismo, visto que sua secreção ocorre à medida que são produzidos, não existindo um órgão de armazenamento. Sabe-se, atualmente, que para o

crescimento ser adequado tanto o IGF circulante de origem principalmente hepática, quanto os IGF produzidos nos tecidos são fundamentais. Este conceito reforça a importância das ações endócrinas, parácrinas e autócrinas dos IGFs (SJOGREN et al., 1999, YAKAR, 2002; MARTINELLI, 2008).

Diversos fatores estão envolvidos na regulação da síntese dos IGFs. O GH é um dos principais promotores da produção de IGF-I, cuja síntese é também estimulada pelos hormônios tireoideanos, esteróides sexuais, insulina e influenciada pelo estado nutricional, dentre outros fatores (JONES, 1995; MARTINELLI et al., 2001).

Além do hipotálamo e hipófise, receptores para IGF-I foram também identificados nos testículos (FLORES et al., 1998), com alguma imunorreatividade detectada nas células de Leydig e Sertoli em humanos. Estes receptores foram também observados em espermátócitos secundários e espermátides jovens na espécie humana segundo Vanelli et al. (1988), além de outras estruturas presentes no sistema reprodutivo masculino (SOUZA, 2004).

A concentração de IGF-I, baixa ao nascimento, eleva-se lenta e gradualmente durante a infância, apresenta pico significativo durante a puberdade e volta a cair na idade adulta, estabilizando-se em patamares superiores aos observados na infância (UNDERWOOD, 1985).

No início da puberdade, a elevação endógena dos hormônios sexuais acompanha-se de aumento na frequência e na amplitude dos pulsos de GH, com aumento de até duas a dez vezes da quantidade de GH secretada a cada pulso (MARTINELLI, 2008). Concomitantemente às alterações da secreção de GH, ocorrem alterações nas concentrações dos integrantes do sistema IGF, algumas delas como consequência direta da elevação das concentrações de

GH. As concentrações de IGF-I elevam-se de maneira significativa durante a puberdade, sem alterações importantes nas concentrações do IGF-II (MARTINELLI, 2005, 2008; UNDERWOOD, 1985; BLUM, 1988).

Após a puberdade, apesar da persistência de concentrações elevadas de esteróides sexuais, a secreção de GH gradualmente retorna a patamares mais baixos, sugerindo a participação de outros mecanismos reguladores da secreção de GH (MARTINELLI 2008;).

Henricks et al.(1998), em estudo com bovinos, notaram a presença de receptores para IGF-I no espermatozóide, a presença desse fator no sêmen, e a habilidade do IGF-I em estimular a motilidade e progressividade espermática.

Em suínos há evidências de que o IGF-I estimula a proliferação e diferenciação das células de Leydig, a produção de testosterona (LIN et al., 1986a), aumento no número de receptores para LH/hCG (PERRARD-SAPORI et al., 1987). O IGF-I é considerado um importante fator para o desenvolvimento de células germinativas e para a maturação do espermatozóide (SOUZA, 2004) e na ativação da motilidade espermática durante a ejaculação (SILVA, 2010).

3.5. O eixo somatotrópico e a reprodução

A secreção de hormônio do crescimento (GH) das células somatotróficas da hipófise anterior é modulada por influências hipotalâmicas estimulatórias e inibitórias (SILVA, 2003)sendo determinada, principalmente, por uma complexa inter-relação entre dois peptídeos hipotalâmicos, o hormônio liberador de GH (GHRH) e a somatostatina (SRIF), que inibe a secreção de GH. Além do GHRH

e da SRIF, diversos outros fatores interferem na secreção de GH, atuando diretamente sobre a hipófise ou sobre a liberação destes fatores hipotalâmicos, tais como neurotransmissores (noradrenalina, serotonina, dopamina, acetilcolina), hormônios periféricos (glicocorticóides, hormônios tireoidianos, esteróides sexuais, insulina), e fatores metabólicos (glicemia, ácidos graxos livres, aminoácidos e quantidade de gordura corporal) (LENGYEL, 1992; SILVA, 2003).

O GH é um dos principais promotores da produção de IGF-I, cuja síntese é também estimulada pelos hormônios tireoideanos, esteróides sexuais, insulina e influenciada pelo estado nutricional, dentre outros fatores (MARTINELLI JR, 2001).

É considerado evidente que o GH e o IGF-I podem exercer efeitos estimulatórios e/ou sinérgicos em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e no trato reprodutivo (CHANDRASHEKAR, 2004). Sendo assim, o GH é considerado importante modulador das funções reprodutivas (HULL, 2001).

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

3.6. Somatotropina recombinante bovina

A somatotropina tem a capacidade de agir nos tecidos muscular, adiposo e hepático. Seus principais efeitos são observados no aumento dos tecidos esqueléticos e musculares, no aumento da disponibilidade de glicose

na circulação e no estímulo sobre o pâncreas para a liberação de insulina (PRADO et al., 2003).

Visando inicialmente o aumento da produção leiteira em ruminantes (BORGES et al., 2001b), foram desenvolvidos processos de produção da somatotropina bovina recombinante (rbST) em escala industrial, a partir da técnica de DNA recombinante em *Escherichia coli* (SANTOS et al., 2001).

Após a aplicação de bST, sua concentração máxima no plasma ocorre no intervalo de dois a três dias, permanecendo significativamente alta por volta de sete dias, alcançando níveis basais até 14 dias após aplicação (RODRIGUES, 2008).

Segundo Lucy et al. (2000), a maior influência da rbST na reprodução é feita de modo indireto, através do IGF-I. O tratamento com rbST eleva a concentração sanguínea de GH, dose dependente, a qual é acompanhada de elevação dos níveis de IGF-I (FURLAN, 1998). O uso do rbST pode melhorar as taxas de fertilização, por agir sobre as características espermáticas ou favorecer seu metabolismo (SOUZA, 2004). Contudo diante dos mecanismos que a somatotropina bovina exógena pode exercer sobre as ações fisiológicas, metabólicas e hormonais no desenvolvimento sexual, há possibilidade de melhorias quanto ao surgimento da puberdade.

HIPÓTESE

O tratamento com somatotropina bovina (bST) tem efeito positivo sobre o desenvolvimento ponderal e sexual de bubalinos machos no período peripuberal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma propriedade rural localizada no município de São Mateus na região central do Estado do Maranhão (região do Médio Mearim) (04° 02' 30" S/ 44° 28' 30" W), entre maio de 2013 e janeiro de 2014. O clima da região é do tipo tropical com temperaturas médias entre 26,5 e 28,4° C e chuvas concentradas em verões quentes conforme classificação Cwa (ADAS, 1983).

Conforme especificado adiante, o manejo dos animais, mensurações testiculares, colheitas de material biológico e avaliação física do sêmen foram realizados na propriedade rural.

As características morfológicas dos espermatozóides foram analisadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Maranhão – UFMA e os ensaios hormonais foram realizados no Laboratório de Endocrinologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba. (FMVA - UNESP).

4.1. Animais experimentais e manejo zootécnico

Foram utilizados 20 machos bubalinos, não castrados, da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) com idade inicial de 12 meses. Os animais foram mantidos em regime de pastejo, em piquetes constituídos por *Brachiaria decumbens*, suplementação mineral e água *ad libitum*.

Tabela 1. Níveis dos componentes do suplemento mineral oferecido por quilograma do produto (Fosbovi 20).

Cálcio (mín)	107,00 g/kg
Cálcio (máx)	132,00 g/kg
Fósforo (mín)	88,00 g/kg
Enxofre (mín)	12,00 g/kg
Sódio (mín)	126,00 g/kg
Cobalto (mín)	55,50 mg/kg
Cobre (mín)	1.530,00 mg/kg
Ferro (mín)	1.800,00 mg/kg
Iodo (mín)	75,00 mg/kg
Manganês (mín)	1.300,00 mg/kg
Selênio (mín)	15,00 mg/kg
Zinco (mín)	3.630,00 mg/kg
Flúor (máx)	880,00 mg/kg

4.2. Delineamento experimental

Visando a distribuição homogênea das unidades experimentais nos respectivos tratamentos, foram realizadas mensurações prévias de peso corporal e biometria testicular, além de tentativas de colheita de sêmen para certificar que os animais ainda não haviam atingido a puberdade.

Os bubalinos foram distribuídos em dois grupos de 10 animais cada (bST vs Controle) em um delineamento de blocos ao acaso com 10 repetições. Os animais do grupo bST foram submetidos à administração via subcutânea de somatotropina bovina recombinante (rbST; Boostin; Laboratórios Elanco; Brasil) a cada 14 dias, e os animais do grupo Controle serviram como testemunha e receberam placebo (soro fisiológico) pela mesma via de administração, volume e intervalo entre aplicações. A quantidade administrada de rbST foi realizada de acordo com a Escala Alométrica para as Taxas Metabólicas Interespecíficas (WEST & BROWN, 2005) que calcula e estima dosagens entre animais de diferentes pesos via alometria exponencial.

Tabela 2. Dosagem de bST e placebo aplicadas a cada 14 dias a partir do dia 0 até o dia 252 do período experimental conforme a Escala Alométrica.

Dias	0 e 28		56, 84 e 112		140		168		196		224 e 252	
Tratamento	Cont	bST	Cont	bST	Cont	bST	Cont	bST	Cont	bST	Cont	bST
Dose (mL)	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,5	1,4	1,4	1,4

4.2.1. Desenvolvimento ponderal e biometria testicular

No início do período experimental, na ocasião das aplicações dos fármacos, foi realizada a pesagem e a avaliação andrológica dos animais. As pesagens foram realizadas a cada 28 dias com a utilização de uma balança eletrônica e o escore de condição corporal através de observação visual da cobertura muscular e de gordura sobre a região lombar, costelas e paleta, numa escala de um a cinco segundo o critério adotado por Machado et al., (2008).

O perímetro escrotal (PE) foi aferido por meio de uma fita métrica flexível, na posição mediana do escroto, no ponto de maior dimensão horizontal, envolvendo as duas gônadas e a pele escrotal. Empregando-se paquímetro, foi medido o comprimento testicular (COMP), medida tomada no sentido dorso-ventral de cada testículo, excluindo a cauda do epidídimo. O diâmetro testicular ou espessura dos testículos (DIÂM) foi aferido mensurando-se a maior distância no sentido crânio-caudal de cada testículo. Os valores finais de comprimento e diâmetro testiculares expressam a média dos dois

testículos. O volume testicular foi calculado empregando a fórmula do cilindro (FIELDS et al., 1979):

$$VOL=2[(r^2) \times \pi \times h],$$

onde r = raio (DIÂM/2), h = comprimento ou altura (COMP) e $\pi = 3,14$.

Segundo a equação, o volume foi expresso em cm³ e representa os dois testículos somados. A forma dos testículos foi determinada pela razão matemática entre o diâmetro e o comprimento (DIÂM/COMP), segundo Bailey et al. (1998), numa escala de 0,5 a 1, onde 0,5 significa DIÂM = 1/2 COMP e 1 significa DIÂM = COMP. Em função desta escala, foram estabelecidas as seguintes formas testiculares:

- razão $\leq 0,5$ = longo;
- razão entre 0,51 e 0,625 = longo/moderado;
- razão entre 0,626 e 0,750 = longo/oval;
- razão entre 0,751 e 0,875 = oval/esférico;
- razão $> 0,875$ = esférico.

4.2.2 Avaliação seminal

Foram realizadas 11 colheitas de sêmen iniciadas às 7 horas da manhã, com intervalo de 28 dias, totalizando 280 dias de experimento. A primeira colheita foi realizada imediatamente antes da primeira administração de bST no grupo tratado. O método utilizado para realizar as tentativas de colheita de sêmen foi a eletroejaculação. A qualidade seminal foi acompanhada por meio de espermograma (volume, motilidade, vigor, concentração e análise morfológica), conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

A avaliação da motilidade e vigor espermáticos foi realizada de imediato pela deposição de uma gotícula de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C e levadas à microscopia de luz com aumento de 400 vezes. A motilidade foi expressa como o percentual de espermatozoides móveis e, o vigor, representando a força do movimento e a velocidade dos espermatozoides, sendo classificado numa escala de zero a cinco, onde zero caracteriza a ausência de movimento e cinco um movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998).

Alíquotas de sêmen foram preservadas em solução formol-salina tamponada (Hancock, 1957), e mantidas em temperatura ambiente para avaliação subsequente da morfologia espermática. Para a avaliação desta, foi empregada a técnica de coloração dos espermatozoides utilizando o rosa bengala realizando a análise do sêmen em microscopia de luz convencional com aumento de mil vezes. As anormalidades espermáticas foram registradas seguindo a localização das mesmas em anormalidades de cabeça, peça intermediária e peça principal (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998). Os defeitos também foram classificados em maiores e menores seguindo a classificação proposta por Blom (1973).

A metodologia utilizada para definir a ocorrência da puberdade seguiu aquela proposta por Garcia et al. (1987). Foram considerados animais púberes aqueles que apresentaram, em exame andrológico, pela primeira vez, espermatozoides móveis no ejaculado, na condição de terem sido considerados não-púberes na avaliação anterior.

4.2. 3. Determinação das concentrações de IGF-I

Imediatamente após as colheitas de sêmen, amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular diretamente em frascos sem anticoagulante para obtenção de soro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 200g por 20 minutos e estocadas a uma temperatura de -20°C até a ocasião da análise.

As concentrações de IGF-I foram dosadas por ensaio imunorradiométrico (IRMA) pelo Kit IRMA ACTIVE DSL-5600.

4.3 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2001). Através do aplicativo GUIDED DATA ANALISYS do SAS®, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias, sendo verificada a necessidade de transformação dos dados (logaritmo na base 10 – $\log_{10} X$; Raiz quadrada – $\sqrt{X}$; Quadrado – X^2), de tal modo que esses atendessem às pressuposições da análise de variância.

As variáveis dependentes de distribuição normal (paramétricas) foram expressas em média e erro padrão da média (média $\pm$ EPM) e analisadas por ANOVA para medidas repetidas no tempo usando o aplicativo PROC MIXED do SAS® e as de distribuição não-normal (não-paramétricas) pelo teste de Wilcoxon (Aplicativo PROC NPAR1WAY WILCOXON do SAS®).

Para as variáveis aparecimento dos primeiros espermatozóides no ejaculado alcance da puberdade e maturidade sexual, foi adotada a distribuição Binomial e as análises foram realizadas pelo PROC GLIMMIX do SAS®

As variáveis classificatórias (independentes) consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram animal e momento da coleta de dados. As variáveis resposta (dependentes) analisadas de acordo com os procedimentos experimentais foram desenvolvimento ponderal e biometria testicular e determinação das concentrações de IGF-I

O nível de significância para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento ponderal e testicular

Não houve efeito da bTS sobre o peso corpóreo ($P=0,21$) nem sobre o escore de condição corporal (ECC) ($P=0,24$) durante o período experimental. Também não houve interação entre tratamento x coleta ($P=0,99$) e ($P=0,72$), mas sim efeito do dia de coleta ($P=0,0001$), mostrando que com o avanço da idade houve um aumento contínuo e progressivo no peso corporal e diferenciação do ECC dos animais no decorrer do período experimental (Figura 1).

O peso corporal não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, iniciando no dia 0 aos 12 meses de idade e médias $248,0 \pm 5,8$ e $248,3 \pm 6,4$, finalizando no dia 280 com 22 meses de idade e médias $303,1 \pm 8,0$

e $309,0 \pm 8,0$ para os grupos controle e bST, respectivamente. O ganho de peso diário geral no período foi de 207 gramas/dia (Controle = 197g/dia; bST = 217g/dia; $P > 0,05$).

O ECC também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos dias de coletas iniciando na coleta 0 com médias $3,2 \pm 0,1$ e $3,1 \pm 0,1$ e finalizando no dia 280 com médias $3,0 \pm 0,0$ e $2,8 \pm 0,0$ para os grupos controle e bST, respectivamente.

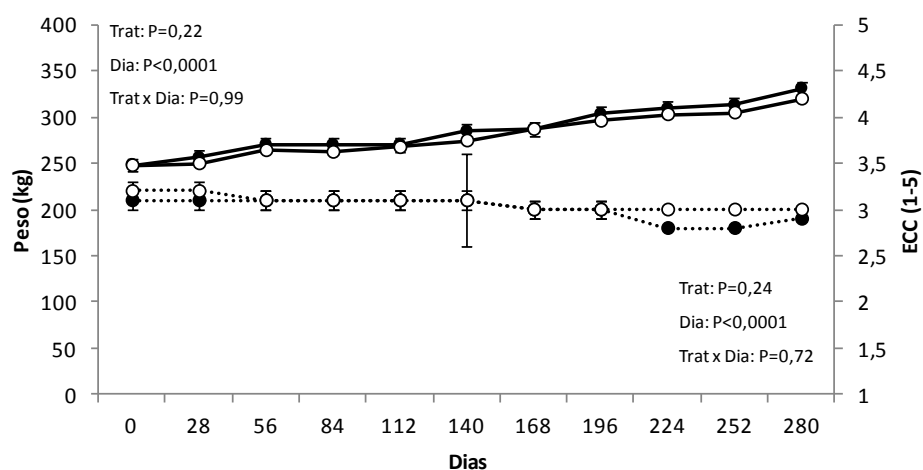


Figura 1. Peso (linhas contínuas) e escore de condição corporal (ECC) (linhas tracejadas), em bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao perímetro escrotal ($P=0,17$; Figura 2), comprimento ($P=0,07$) e largura testicular ($P=0,17$) (Figura 3) e volume testicular ($P=0,27$; Figura 4). Tanto o grupo bST quanto o grupo controle sofreram efeito de dias de coleta ($P < 0,0001$) mostrando incremento no desenvolvimento testicular.

As formas testiculares avaliadas nos tratamentos não apresentaram diferença mantendo uma média geral na razão do cálculo matemático entre 0,51 e 0,62 o que os caracteriza como tendo formato testicular longo/moderado, exceto no dia 280 em que o grupo controle apresentou uma média de $0,63 \pm 0,04$ sendo assim considerado longo/oval (razão entre 0,63 e 0,75) enquanto o grupo bST, com média $0,57 \pm 0,01$, manteve-se com a forma testicular longo/moderado.

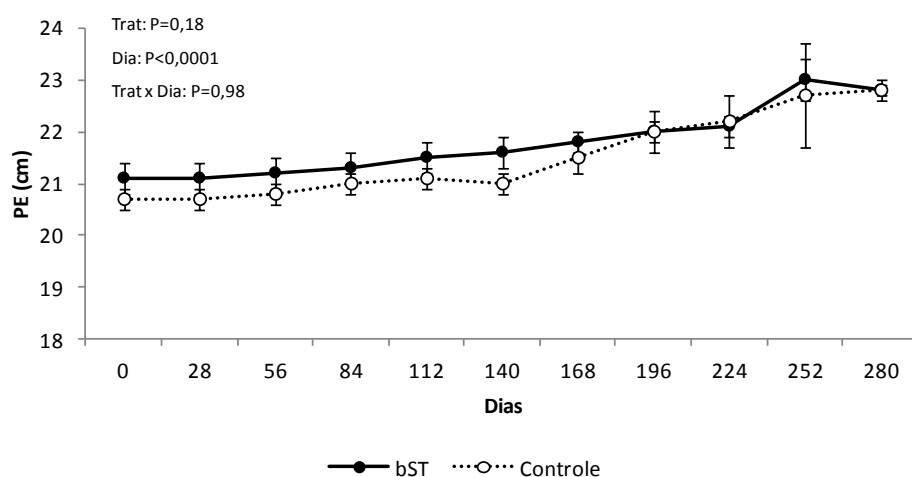


Figura 2. Perímetro escrotal em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) bST.

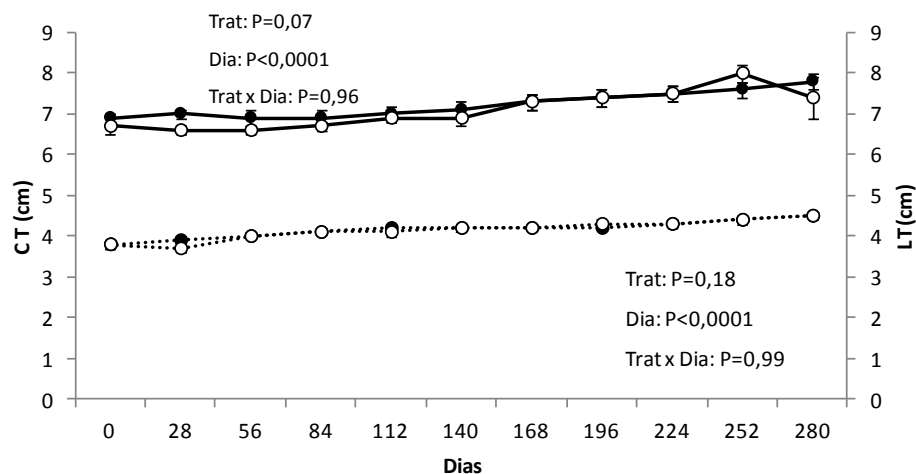


Figura 3. Comprimento (linhas contínuas) e largura testicular (linhas tracejadas) em bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

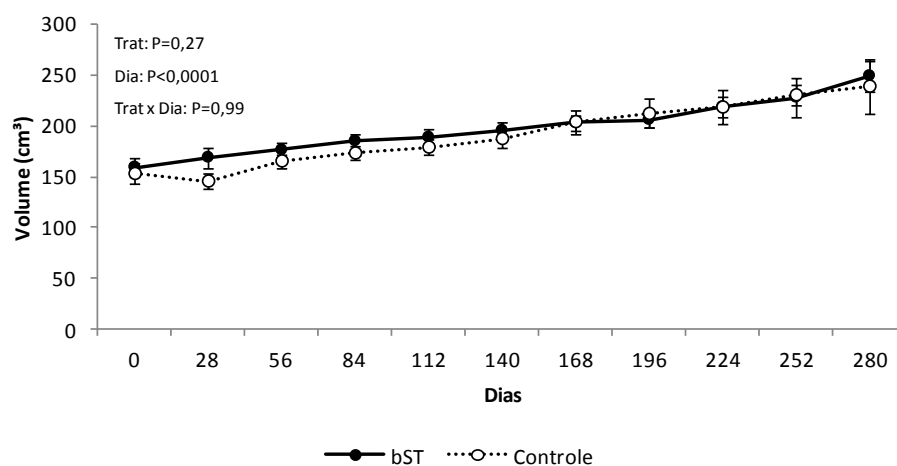


Figura 4. Volume testicular (VT cm³) em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

Quanto à presença de espermatozóides no ejaculado (móveis ou imóveis), não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5). A porcentagem de animais com presença de espermatozóides imóveis no ejaculado pôde ser observada primeiramente em um animal do grupo bST (10%) no dia 28 (coleta 2), permanecendo inalterado até o dia 84, que corresponde à coleta 4, na qual ocorreram espermatozóides imóveis também no grupo controle (10%).

Não houve efeito de tratamento ($P=0,33$), nem interação tratamento x dia ($P=0,98$), mas houve efeito de dia de coleta ($P<0,0001$), caracterizando o surgimento de animais apresentando espermatozóides no decorrer do experimento, independentemente do tratamento com bST.

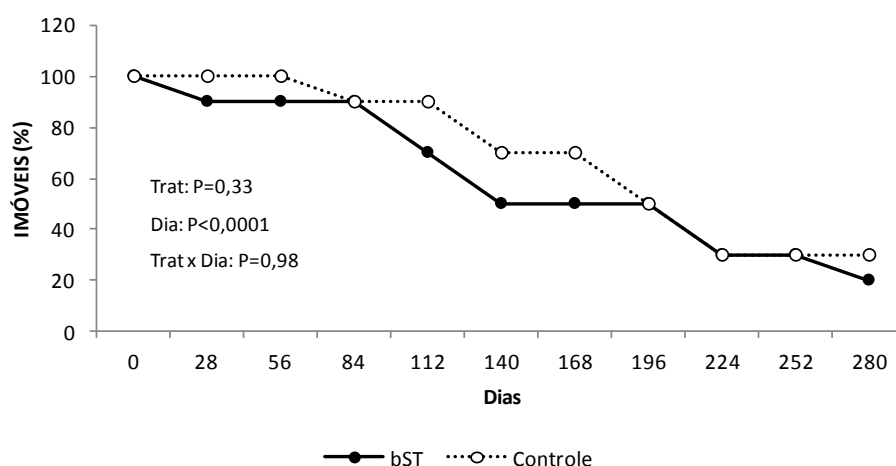


Figura 5. Curva de sobrevivência da presença de espermatozoides (%) no ejaculado em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

No dia 112 foi registrado o primeiro animal púbere, pertencente ao grupo bST e na coleta seguinte no dia 140 foi registrado o primeiro animal púbere do grupo controle. Ao final do experimento, no dia 280, o percentual de animais públicos foi de 70% no grupo bST e 50% no grupo controle.

Na figura 6, se pode notar que o grupo bST apresentou tendência ($P=0,054$) a um maior percentual de animais apresentando puberdade. Podemos observar também que houve efeito de dias de coleta ($P<0,0001$) mostrando uma evolução no surgimento de animais públicos em ambos os grupos.

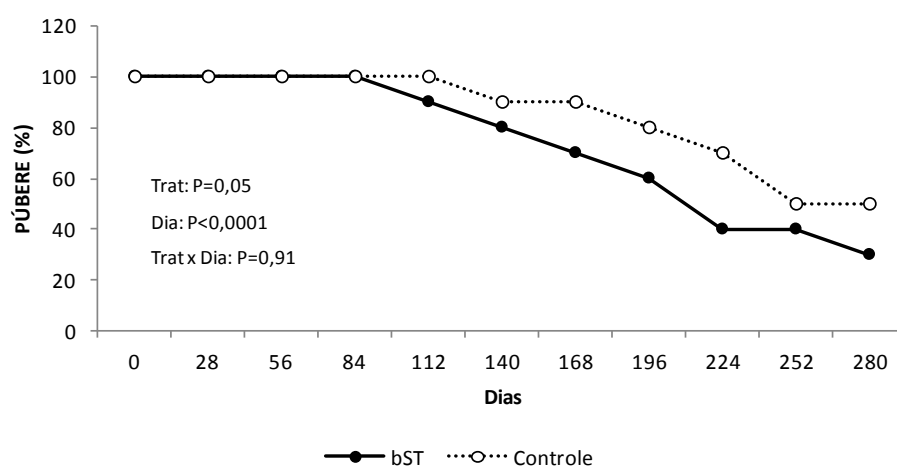


Figura 6. Curva de sobrevivência da presença de espermatozoides móveis (púbere) no ejaculado em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

5.2. Características físicas e morfológicas do ejaculado

Os resultados apresentados adiante para características físicas e morfológicas do ejaculado são baseados nas médias somente dos animais nos quais foram encontrados espermatozóides no ejaculado. Estes ajustes são decorrentes de eventuais insucessos nas tentativas de coleta por eletroejaculação.

Não houve efeito geral de tratamento com bST sobre a motilidade ($P=0,89$) (Figura 7) e o vigor espermáticos (Figura 8) ($P=0,55$). Não foi possível analisar os tratamentos no dia 168 por não se ter obtido êxito na eletroejaculação no grupo controle.

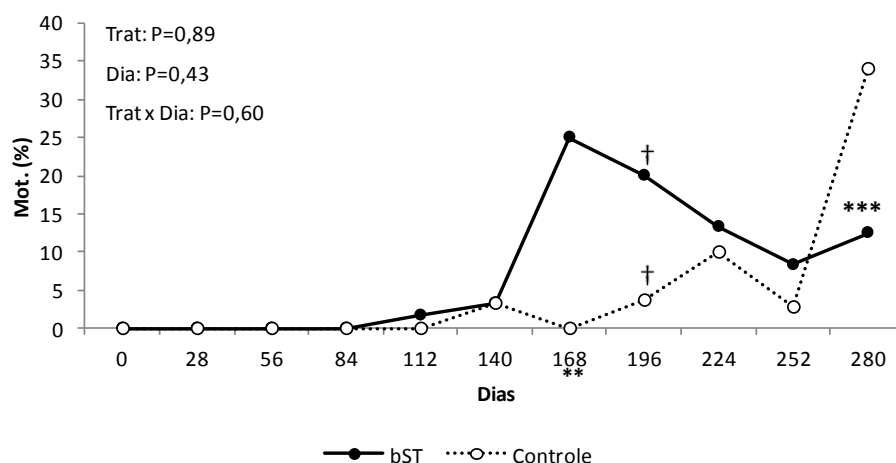


Figura 7. Motilidade espermática em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

†: Tendência a um efeito significativo ($P<0,1$).

**Nenhum animal do grupo controle respondeu à eletroejaculação no dia 168.

*** Não pôde ser comparado por corresponder ao valor de um único animal, não apresentando assim EPM.

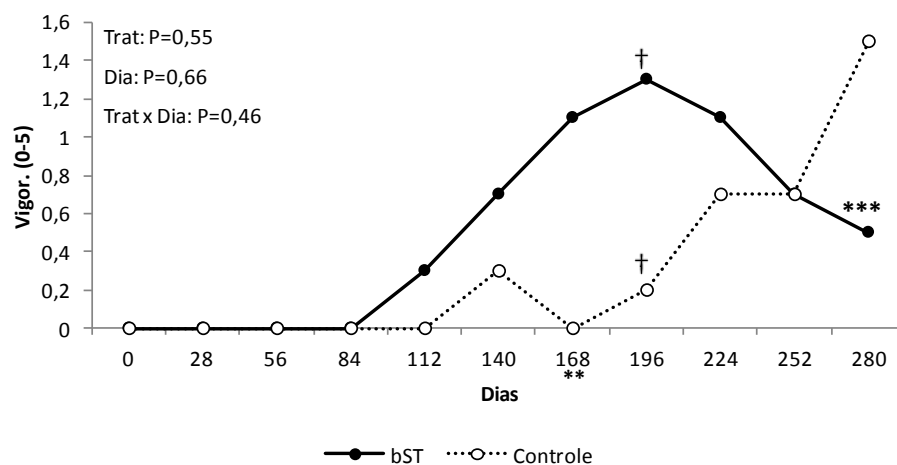


Figura 8. Vigor espermático em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

†: Tendência a um efeito significativo ($P < 0,1$).

**Nenhum animal do grupo controle respondeu à eletroejaculação no dia 168.

*** Não pôde ser comparado por corresponder ao valor de um único animal, não apresentando assim EPM.

Os resultados das análises morfológicas espermáticas estão apresentadas nas figuras 9 a 13.

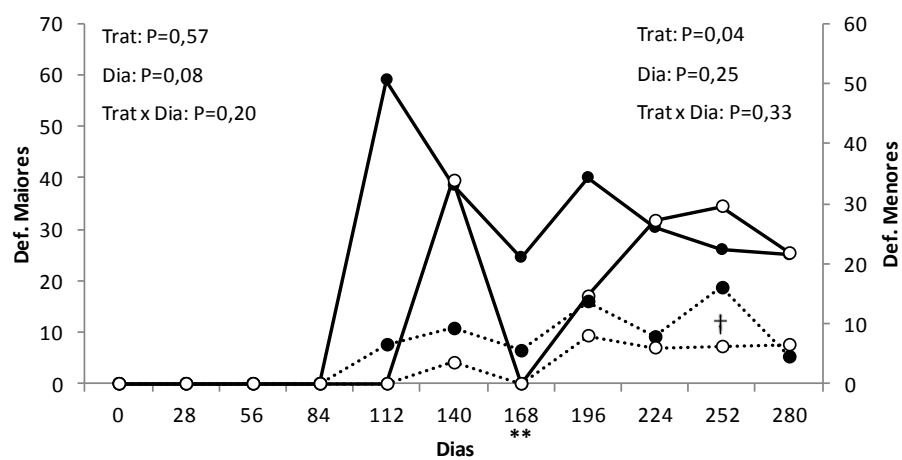


Fig. 9. Defeitos espermáticos maiores (linhas contínuas) e menores (linhas tracejadas) em bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

†: Tendência a um efeito significativo ($P < 0,1$).

**Nenhum animal do grupo controle respondeu à eletroejaculação no dia 168.

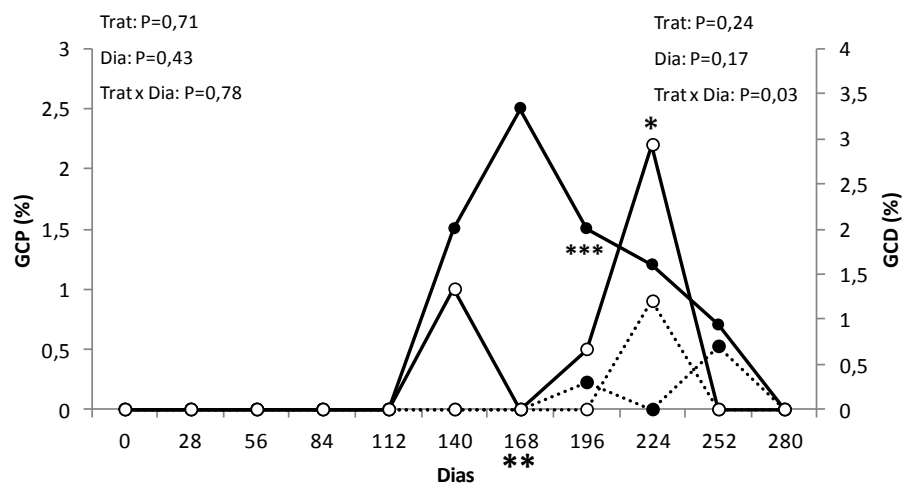


Figura 10. Defeitos de Gota Citoplasmática Proximal (linhas contínuas) e Distal (linhas tracejadas) em espermatozóides de bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

*Diferença significativa ($P < 0,05$).

**Nenhum animal do grupo controle respondeu a eletroejaculação no dia 168.

*** Não pôde ser comparado por corresponder ao valor de um único animal, não apresentando assim EPM.

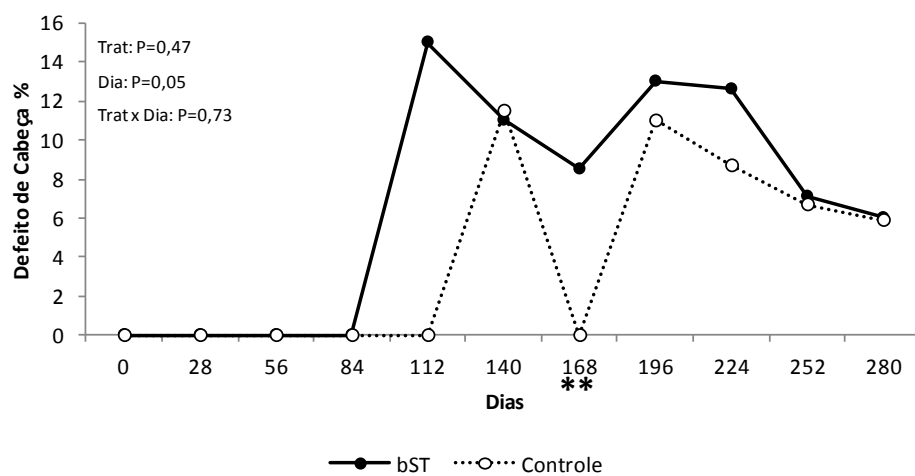


Figura 11. Defeitos de Cabeça em espermatozóides de bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) e não tratados (linha tracejada com círculos abertos).

** Nenhum animal do grupo controle respondeu a eletroejaculação no dia 168.

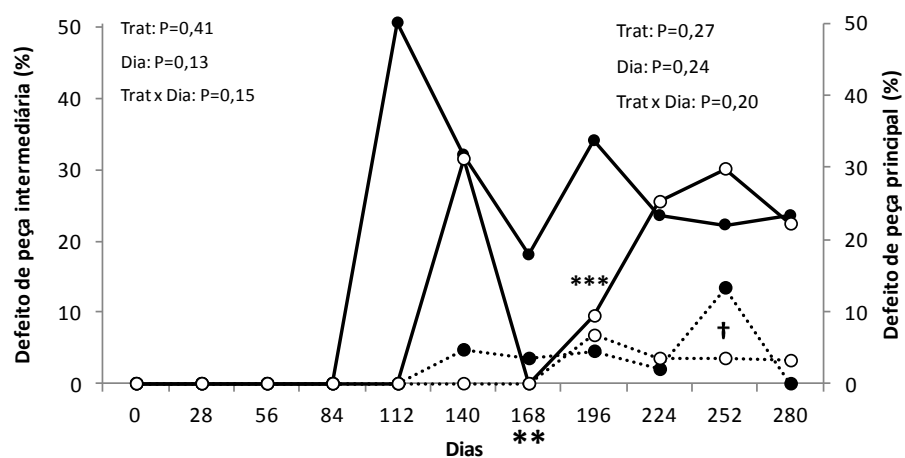


Figura 12. Defeitos de peça intermediária (linhas contínuas) e de peça principal (linhas tracejadas) em espermatozóides de bubalinos machos tratados (círculos sólidos) ou não (círculos abertos) com bST.

†: Tendência a um efeito significativo ($P < 0,1$).

** Nenhum animal do grupo controle respondeu a eletroejaculação no dia 168.

*** Não pôde ser comparado por corresponder ao valor de um único animal, não apresentando assim EPM.

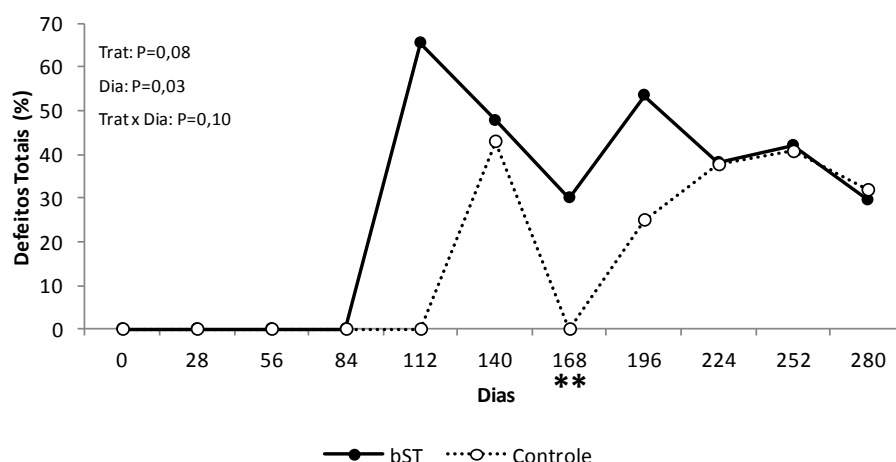


Figura 13. Defeitos Totais de espermatozoides em bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos) com bST.

**Nenhum animal do grupo controle respondeu a eletroejaculação, não podendo assim ser comparado os resultados de morfologia no dia 168.

5.3. Concentrações de Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I)

As concentrações sanguíneas de IGF-I não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($P=$), sendo que houve uma tendência a maior concentração para o grupo controle ($451,05 \pm 40,3$) do que o grupo bST ($364,37 \pm 28,0$) no dia 280. Também foi observado efeito de dias de coleta ($P < 0,0001$) indicando mudanças nas concentrações nos diferentes dias, ocorrendo de forma similar para os dois grupos. Neste estudo, além de não ocorrer efeito do tratamento, não houve interação entre tratamento e dias de coleta.

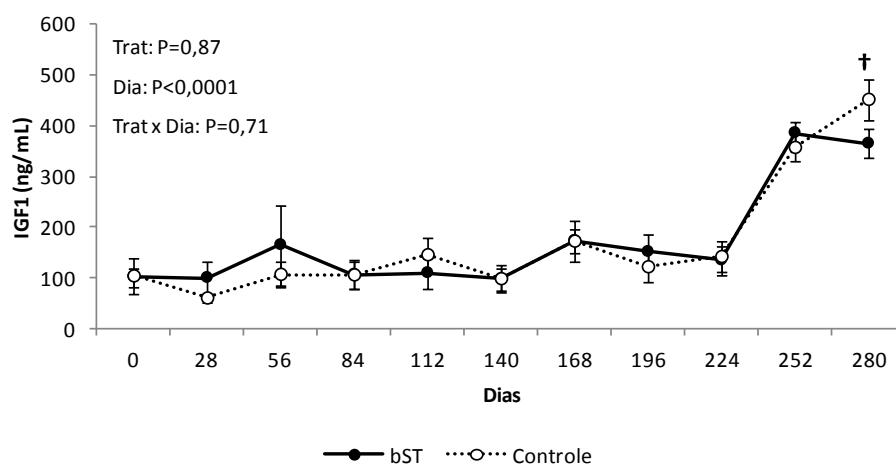


Figura 14. Dosagem de IGF-I (ng/mL) de bubalinos machos tratados (linha contínua com círculos sólidos) ou não (linha tracejada com círculos abertos).

†: Tendência a um efeito significativo ($P < 0,1$).

6. DISCUSSÃO

A hipótese inicial do presente estudo de que a administração de somatotropina bovina (bST) teria efeito positivo sobre o desenvolvimento ponderal e sexual de bubalinos machos no período peripuberal foi rejeitada.

Não houve efeito da bST no aumento de peso corpóreo, tampouco no escore de condição corporal (ECC). Nos meses referentes às coletas dos dias 56, 84 e 112, quando a oferta de forragem foi menor, os animais apenas mantiveram o peso registrado na coleta anterior. O peso corporal não diferiu entre os grupos controle e bST mantendo-se um crescimento similar entre eles no decorrer do experimento, apresentando uma curva de crescimento já

esperada para a espécie (OWENS et al., 1993). A redução do ECC também é fisiológica no período peripuberal, pois o desenvolvimento ósseo é maior em relação à musculatura e deposição de gordura, quando o animal atinge seu crescimento máximo o desenvolvimento ósseo cessa e a musculatura e deposição de gordura são bem mais acentuadas (CUNNINGHAM, 2004).

Estes resultados condizem com os encontrados por Moreira et al. (2002) que, administrando 0,15 mg kg/PV/dia de bST, em bezerros mestiços (Simental/Nelore) criados a pasto *ad libitum* e em “creep-feeding” (complexo mineral-protéico (Nutrumin® *creep feeding*) com 19% de PB e 77% de NDT, mostram que o bST não promoveu aumento para o ganho de peso vivo. Vann et al. (1998), trabalhando com uma dosagem de 0,09 mg Kg/PV/dia de bST, não relataram aumentos no ganho de peso final. Assim como Chardulo et al. (1998), empregando uma dosagem de 250 mg a cada 14 dias, que compararam em seu estudo o efeito do bST entre bezerros Nelore e mestiços Nelore x Simental confinados e não encontraram diferenças no ganho de peso diário e peso vivo final em nenhuma das raças estudadas.

O perímetro escrotal aqui observado aproxima-se dos registrados para os bubalinos Murrah nesta faixa etária. Vale et al. (2004) encontraram dos 12 aos 23 meses de idade médias que variavam de 21 a 25cm em touros jovens Murrah, entretanto, inferior ao encontrado por Ohashi (2011), em bubalinos mestiços (Mediterrâneo x Murrah) que, entre 13 e 24 meses, o perímetro testicular variou de 23,7 a 28,2cm. Já Ayala (2011) estudou búfalos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) criados em sistema extensivo e observou médias entre 12,9 e 18,8cm aos 12 a 20 meses de idade e de 22,8 aos 22 meses.

Barbosa (2009), trabalhando com bubalinos em sistema intensivo e em sistema extensivo, concluiu que quanto mais intensivo é o manejo dos animais, maior será o perímetro escrotal. Quanto aos tratamentos, não houve diferença significativa, correspondendo aos resultados obtidos por Amorim (2004), que comparando o efeito do bST (500mg) entre touros de faixas etárias médias de 13,37 meses e 20,62 meses, ambos Nelore, não tendo observado diferença significativa. Esses dados também são confirmados por Garcia (2005) que em seu estudo com touros Simental, não encontrou efeito significativo da bST.

Já em um trabalho realizado com novilhos de corte e aplicações de 250 e 500 mg de bST foi relatado que houve efeito do bST sobre o perímetro escrotal (Gomes, 2001).

O volume testicular, calculado utilizando a fórmula do cilindro de Fields et al. (1979) através do diâmetro e comprimento testicular, também não diferiu entre tratamentos. Esses dados também correspondem aos achados por Amorim (2004) reportando que não houve efeito do bST sobre o volume testicular tanto em touros jovens quanto em adultos. Em mensurações testiculares de 70 búfalos mestiços Murrah x Jafarabadi não tratados com bST, Pacheco et al. (2005) encontraram aos 12, 18 e 24 meses de idade, volume testicular médio de 244,45; 598,60 e 1162,68cm³ respectivamente. Neste estudo, o volume testicular referente aos 12 meses foi próximo, com 253,1cm³. Porém, dos 18 aos 24 meses foram consideravelmente menores, sendo de 204,0 e 238,8cm³, respectivamente.

O formato testicular não sofreu alteração durante o período experimental, exceto aos 22 meses de idade em que a média do grupo controle passou de longo/moderado a longo/oval. Esta mudança no formato testicular é,

de certo modo, esperada que ocorra com a idade, pois segundo Unanian et al. (2000) os animais nesta fase encontram-se em desenvolvimento e os testículos crescem tanto em largura como em comprimento.

Conforme descrito nos resultados, os animais criados em sistema de pastejo extensivo não apresentaram espermatozóides no ejaculado (tanto móveis quanto imóveis) aos 12 meses de idade. Aos 14 meses o grupo bST apresentou espermatozóides imóveis no ejaculado (10%) enquanto que no grupo controle isto ocorreu aos 15 meses.

Neste quesito houve apenas efeito do tempo, pois ambos os grupos apresentaram um aumento no percentual de animais com espermatozóides imóveis no ejaculado ao longo das coletas sucessivas ($P < 0,0001$). Esta é uma característica reprodutiva fisiológica, pois os testículos ainda em desenvolvimento aumentam gradativamente sua responsividade aos comandos hipofisários, sofrendo ação dos hormônios FSH e LH e originando a secreção de hormônios sexuais secundários. No final desta fase é que se inicia o processo de espermatogênese quando então, o animal atingirá a puberdade (VALE e AGUIAR, 2006).

A puberdade, caracterizada pela presença de espermatozóides móveis no ejaculado, foi registrada nesta pesquisa pela primeira vez aos 16 meses no grupo bST (10%) e aos 17 no controle, alcançando, aos 22 meses de idade, 70% e 50 % dos animais dos respectivos grupos.

Não se observou efeito do bST sobre a precocidade reprodutiva dos animais quanto à antecipação da puberdade, resultados estes que corroboram com o achado por Rodrigues (2010) em que a utilização de rbST em fêmeas caprinas em crescimento não alterou os parâmetros de precocidade sexual.

Mellado et al (2012) estudando caprinos jovens recebendo duas dietas com níveis energéticos adequados (dieta padrão, 2,36 EM e dieta aumentada, 2,95 EM) com ou sem aplicações de bST observaram que ambas as dietas com aplicações crônicas de bST melhorou a taxa de crescimento, no entanto nenhum destes efeitos alterou o perímetro escrotal final, metabólitos sanguíneos e produção de esperma. Ribeiro et al (2006) em sua pesquisa sobre ocorrência da puberdade em animais criados em sistema intensivo ou extensivo observou que criados intensivamente os animais atingiam a puberdade até os 15 meses de idade, já os animais criados extensivamente atingiram puberdade aos 24 meses de idade. Neste estudo, considerando todos os 20 animais experimentais, aos 22 meses de idade 60% dos animais se encontravam púberes aproximando-se ao observado pelo autor na condição de manejo extensivo.

A puberdade tardia neste caso pode ter ocorrido devido à criação dos animais em sistema extensivo e às variações sazonais na oferta de forragem de qualidade principalmente no período seco, pois segundo Miranda Neto (2011) a quantidade e a qualidade de alimento reduzida modulam o desenvolvimento dos animais tornando-o mais lento.

Fourie et al. (2004) avaliando carneiros jovens criados em dois sistemas, intensivo e extensivo, observou que animais criados em sistema intensivo apresentaram maior perímetro escrotal, porém afirma que quantidades grandes de energia fornecidas *ad libitum*, resultam em maior acúmulo de gordura, prejudicando a qualidade das características físicas do sêmen. Assim, deve-se fazer uma dieta balanceada a fim de evitar excessos ou faltas na alimentação.

Em animais criados somente a pasto o período seco pode ter influência em sua eficiência reprodutiva (GUNN et al, 1942) sendo que animais mais jovens estão mais susceptíveis a esta influência do que animais adultos, podendo sofrer atraso no desenvolvimento testicular, glândulas vesiculares, ampolas e epidídimos (Brown, 1994) ocorrendo puberdade mais tardia.

Apesar de ter sido detectada a puberdade na maioria dos animais, durante o período experimental, nenhum deles alcançou a maturidade sexual, (70% de motilidade e 30% de anormalidades, segundo o CBRA 1998). Assim, no geral, a motilidade e o vigor espermáticos permaneceram baixos, com valores similares nos grupos. Estes achados corroboram com os encontrados em bovinos por Garcia (2005) e Souza (2004) que avaliaram animais da raça Simental, e também não encontraram diferença significativa entre o grupo controle e o grupo bST, assim como entre os animais insulados e não insulados tratados com bST.

Vieira (2007), trabalhando com touros predominantemente europeus e avaliando motilidade espermática pré-congelamento também não observou efeito do bST nos animais. Já Amorim (2004) e Sauerwein et al. (2000) observaram efeito do tratamento sobre as características físicas do sêmen, motilidade e vigor, em bovinos adultos.

Souza (2004) cita que além dos mecanismos na esteroidogênese e na espermatogênese o bST parece ter importância em características específicas e essenciais à potencial fertilidade dos espermatozóides.

Observa-se neste experimento um declínio quanto à motilidade nos dias 196, 224, 252 que correspondem à época mais quente do ano (outubro, novembro e dezembro). Em bovinos criados em climas tropicais, há uma queda

na produção de espermatozóides e da qualidade do sêmen durante a estação quente (REKWOT et al , 1987), sendo que bovinos *Bos tauros* e mestiços apresentam menor produção e qualidade espermática no período quente em relação aos *Bos indicus* (KUMI - DIAKA et al., 1981) onde a melhor adaptação às condições ambientais poderia ter sido responsável por essa observação (BRITO et al., 2002).

O sêmen do búfalo pode apresentar problemas associados aos aspectos climáticos ou estacionais, em face de grande sensibilidade do epitélio seminífero ao aumento da temperatura ambiental (VALE et al., 2008). Segundo Castro et. al. (2006), trabalhando com búfalos Murrah e Castro et al (2007), com búfalos Mediterrâneo, mostrou que o inverno (época de temperaturas amenas) apresentou condições mais favoráveis para produção de sêmen.

As características físicas do sêmen de bubalinos, de acordo com pesquisas citadas por Ayala (2011), sofrem mudanças dependendo da estação do ano, afirmando que durante o período chuvoso, o sêmen apresenta-se com melhor qualidade, diminuindo no período seco. Ohashi, Sousa e Vale (1988) além de concordarem com estes autores, complementam informando que na estação chuvosa, entre janeiro e julho nas regiões tropicais, é o melhor período para colheita e congelamento de sêmen.

Adicionalmente, no estudo aqui apresentado, observou-se uma descontinuidade de resposta à eletroejaculação em subseqüentes dias de coleta. Este aspecto já havia sido relatado por Barbosa et al (2007) que, em um experimento com búfalos Murrah, observou que 100% dos animais entre 15 e 16 meses não obtiveram êxito na eletroejaculação ou na massagem das ampolas dos ductos deferentes e glândulas vesiculares. Ainda, neste mesmo

estudo 60% dos animais já eram capazes de ejacular aos 19 meses e 82% após os 25 meses. Estes achados corroboram entre si e convergem para a opinião de que, dentre os métodos de coleta, a eletroejaculação não deve ser a mais usual uma vez que o búfalo mostra sensibilidade variável ao estímulo elétrico (Barbosa et al, 2007; Ohashi,1988).

Os resultados do estudo da morfologia espermática também foram bastante variáveis que, no geral, não demonstraram efeito da bST sobre o total de células anormais. Segundo Amorim (2004) os defeitos espermáticos em animais jovens devem-se à imaturidade, visto que a espermatogênese ainda pode ser incompleta nos animais jovens, com maturação incompleta dos ductos epididimários e das glândulas sexuais acessórias. O mesmo autor, em seu estudo, mostra que os defeitos espermáticos não foram influenciados pela aplicação de bST para touros adultos, mas diferiu para os animais jovens apenas em relação aos defeitos menores correspondendo com os dados encontrados neste estudo, em que observamos menor percentual de anormalidades em animais tratados com bST. Souza (2004) não observou efeito no bST sobre as características morfológicas no sêmen de bovinos.

Ainda, foi notado que a maioria das anormalidades espermáticas ocorreram na época quente do ano (outubro a dezembro). Este pode ser o motivo do aumento no percentual de anormalidades estudadas, pois, segundo Garcia (2006) existe uma variação da qualidade seminal em função da época do ano, o que pode ser atribuído, principalmente, a um efeito da temperatura ambiental sobre os eventos reprodutivos.

Gomes (2001), aplicando dosagens de 0, 250 e 500 mg de bST, não encontraram evidência de que as dosagens hormonais tenha influenciado as

características morfológicas do sêmen de novilhos de corte pré-púberes. Já Sauerweins et al (2000) encontraram diminuição das anormalidades espermáticas em touros tratados com bST.

As concentração de IGF-I encontradas neste estudo foram maiores, comparando a média geral do grupo bST (172,1ng/mL) e do controle (170,0ng/mL), do que às encontradas por Souza (2004), 132,3 e 112,4 respectivamente. Velayudhan (2007) estudando bovinos em fase de crescimento, encontrou concentrações crescentes de IGF-I, com aumento ocorrendo de 153,7 para 352,3 ng/mL entre 200 e 400 dias de idade . Nesse estudo os animais apresentaram concentrações de IGF-I variando de 103,52 ng/mL aos 12 meses até 407,6 ng/mL aos 22 meses, porém este crescimento não foi completamente linear.

Henricks et al. (1998) encontraram médias de IGF-I variando de 116-144 ng/mL no plasma seminal de bovinos. Vieira et al (2010) avaliando o efeito do bST sobre as concentrações sanguíneas de IGF-I em touros Aberdeen Angus e Brangus que receberam dosagens de 500mg de bST não encontrou efeito do tratamento, sendo os valores de IGF-I próximos de 400 ng/mL no dia 0 e próximos a 600 ng/mL no dia 56 para ambos os grupos, encontrando apenas efeito de dias de coleta. Estes autores sugerem que este resultado se atribui à condição corporal ótima dos animais baseado no reportado por Caldeira et al (2007) que a condição corporal elevada está associada a concentrações elevadas de IGF-I no sangue.

Holzer et al. (1999) aplicando 500 mg de bST em bezerros da raça Holandesa não observaram diferença entre os tratamentos, obtendo valores médios nas concentrações de IGF-I de 310,0 ng/mL no grupo controle e 257,0

ng/mL no grupo bST. Segundo o autor devem estar presentes quantidades de nutrientes suficientes para que ocorra ação do GH que efetuará uma redução líquida de lipídios. O plano de alimentação pode ter um grande efeito sobre a resposta alcançada por administração de GH (PETERS, 1986), sendo assim a alimentação adequada necessária para uma utilização ótima de GH (BREIER et al., 1988a, b) o que influenciará o IGF-I devido ao efeito positivo do GH em suas concentrações (SOUZA, 2004).

Neste estudo, o fato de não ter ocorrido diferença nas concentrações de IGF-I entre os tratamentos, pode ter relação com o exposto acima, uma vez que, em sistema de criação extensiva os animais estão sujeitos a intensas variações dietéticas, sobretudo em épocas secas do ano nas quais a qualidade nutricional da forragem diminui.

Segundo Dawson et al. (1992) e Thissen et al. (1994) os níveis de nutrientes consumidos influenciam as concentrações de somatotropina e de IGF-I e, segundo Santos et al. (1999) é possível que a liberação de IGF-I medie o efeito do GH sobre a espermatogênese. Ainda, Rausch (2002) complementa afirmando que a bST só pode ser efetiva quando uma nutrição ótima está disponível, em especial nos animais mais jovens, e, portanto, a formulação de dietas relativas ao estado fisiológico do animal é essencial para maximizar o efeito da bST.

Levando em consideração estes argumentos, seria coerente não haver efeitos significativos da bST no ganho de peso, escore corporal e medidas testiculares, bem como sobre as concentrações de IGF-I.

7 CONCLUSÃO

A utilização de bST não resulta em efeitos positivos sobre o desenvolvimento ponderal e sexual, antecipação da puberdade e concentrações sanguíneas de IGF-I em bubalinos machos no período peripuberal.

REFERÊNCIAS

AHIMA, R.S.; SAPER, C.B.; FLIER, J.S.; et al. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, n.3, p. 263-307, 2000.

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

AMORIM, L.S. **Características seminais, biometria testicular, concentrações metabólicas e hormonal e desempenho produtivo de touros da raça Nelore tratados com somatotrofina bovina recombinante (r-bST)**. 2004. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

ANDERSON, K. N.; ANDERSON, L. E.; GLANZE, W. D. **Mosby'S Medical, Nursing and Allied Health Dictionary**. 5. Ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., p. 998, 1998.

AYALA, H.D.M. **Ultrassonografia testicular, em machos bubalinos criados em regime extensivo no Estado do Pará**. 2011. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.

BAILEY, T.L.; HUDSON, R.S.; POWE, T.A. et al. Caliper and ultrasonographic measurement of bovine testicles and mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, p.581-594, 1998.

BARBOSA, E.M. et al. Evaluation spermatic profile in establish of puberty and sexual maturity in the Brazilian Buffaloes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007.

BARBOSA, E. M. **Prevalência de Patologias no Trato Genital de Machos Bubalinos (*Bubalus bubalis*) nos Estados do Pará, Amapá e Baixo Amazonas, Brasil**. 2009. 84f. Dissertação (mestrado em ciência animal) Universidade Federal do Pará, 2009.

BELBER, S.J. et al. Effects of insulin-like growth factor-I on androgen production by highly pubertal and adult rat Leydig cells. **Journal of Andrology**, v.13, p. 125-130, 1992.

BLUM, W.F.; RANKE, M.B.; BIERICH, J.R. A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 118 (3), p. 374-380, Jul.1988.

BORGES, A.M. et al. Resposta superovulatória de novilhas mestiças Holandês-Zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rBST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1439-1444, 2001b.

BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D.; BASS, J. J. Influence of nutritional status and oestradiol-17B on plasma growth hormone, insulin-like growth factors I and II and the response to exogenous growth hormone in young steers. **Journal Endocrinology**. v. 118, p. 243-250,1988a.

BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D.; BASS, J. J. The somatotrophic axis in young steers: Influence of nutritional status on oestradiol 17B on hepatic high- and low-affinity somatotrophic binding sites. **Journal Endocrinology**. v. 116, p. 169-177. 1988b.

BRITO, L. F. C.; et al. effect of age and genetic group on characteristics of scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brasil. **Theriogenology**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

CALDEIRA, R.M. et al. The effect of long-term feed restriction and overnutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. **Small Rumin Res**. v. 68, p. 242–255, 2007.

CAMPOS, G. **Somatotropina Recombinante: Uma ferramenta para aumento da eficiência produtiva**. 2008. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1595>>. Acesso em: 21 abr de 2012.

CASTRO, T.A.M.; PIRES, R.M.L.; CASTRO JR., F.G. Seasonal effects on semen quality of Murrah buffalo bulls. **Animal Reproduction**. v.3, n.2, p.250, 2006.

CASTRO, T.A.M.; PIRES, R.M.L.; CASTRO JR., F.G. Seasonal effect on semen quality of Mediterranean buffalo bulls. In: CONGRESSO BRASILEIRO

DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007.

CHARDULO, L.A.L. et al. Efeito da Somatotropina Bovina Recombinante no desempenho e características químicas da carne de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.2, p. 205-212, 1998.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). The testis. New York: **Academic Press**, v. 1, cap. 6, p. 339-432, 1970.

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

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 578p.

DAWSON, J. M. J. et al. Influence of diet and β -agonist administration on plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in young steers. **Br. J. Nutr.** v. 70, p. 93-102, 1992.

DUARTE, N. P., VIEIRA, M. B., BIANCHI, I., MASCHIO, E.C.K., FONSECA, M., CORRÊA, M. N. **Efeito da somatotropina recombinante bovina sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides bovino pós-congelamento**. XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. VIII Encontro de Pós-Graduação. UFPEL, Pelotas, RS, 2006.

EVANS, A. C. O.; et al. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. **Theriogenology**, v. 43, p. 569-578, 1995.

FIELDS, M. J. ; BURNS, W. C. ; WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **J Anim Sci**, v. 48, p. 1229-1334, 1979.

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

FRENEAU, G.E.; et al. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de

capacidade andrológica por pontos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**. v. 58, no.6 p. 0102-0935, 2006.

FURLAN, L.R. **Efeito do hormônio de crescimento bovino recombinante (rbst) sobre o desempenho e expressão gênica do IGF-I, do hormônio de crescimento e seu receptor em bovinos de corte**. 1998. 86f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

GARCIA, A.R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). **Revista de Ciências Agrárias**, n. 45, p.1-13, jan/jun. 2006. Suplemento.

GARCIA, J.M.; PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical characteristics of Young Guzerá bulls. **Archives. Veterinary**, v.3, p. 47-43, 1987.

GREGORY, J. W. **Avaliação do desenvolvimento testicular de equinos da raça crioula no período da Peri-puberdade**. 2012. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GRIFFIN, J.E. Male reproductive function. In: GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R (Eds.). **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, p.165-185, 1988.

GOMES, G. S. **Influência da somatotropina bovina recombinante (rBST) sobre o ganho de peso e desenvolvimento testicular de novilhos de corte**. Lavras, MG: UFLA, 2001. 51p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Lavras, 2001.

GUIMARÃES, A. A. **Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen ovino (*Ovis aries*)**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

GUIMARÃES, J. D. **Puberdade e maturidade sexual em touros da raça Gir criados em condições semi-extensivas**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais

GUNN, R.M.C.; SANDERS, R.N.; GRANGER, W. Studies in fertility in sheep. 2. Seminal changes affecting fertility in rams. **Bull Coun Sci Industr Res Aust.**,1942;148, 1-140..

HAFEZ, E. S. E; JAINUDEEN, M. R; ROSINHA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Barueri, SP: Manole, 1954. 513p.

HAMMOND, J. Physiological limits to intensive production in animals. **Br. Agric. Bulletin**. v. 4, p. 222-224, 1952.

HENRICKS, D.M. et al. Identification of insulin-like growing factor in bovine seminal plasma and its receptors on spermatozoa: influence on sperm motility. 1. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 330-337, 1998.

HOLZER Z.; AHARONI. Y.; BROSH, A.; ORLOV, A; VEENHUIZEN, J.J.; KASSER, T.R. The effects of long-term administration of recombinant bovine somatotropin (Posilac) and Synovex on performance, plasma hormone and amino acid concentration, and muscle and subcutaneous fat fatty acid composition in Holstein–Friesian bull calves. **Journal Animal Science**, v.77, p. 1422–1430, 1999.

IBGE, 2010. **Efetivo de bubalinos no território brasileiro**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab11.pdf> Acesso em: 13 mai 2013.

JANAKIRAMAN, K. Some Aspects of reproductive problems in buffaloes. In: World Buffalo Congress, 2. 1988. New Deli-India. **Anais...**New Deli.1988.

JONES, J.I.; CLEMMONS D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 3-34, 1995.

KOONJAENAK, S. **Semen and Sperm Characteristics of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bulls for Artificial Insemination in Thailand, in Relation to Season**. 2006. 50 F. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2006

LENGYEL, A.M.J. GH secretion in obesity. In: De La Cruz LF, ed. **Regulation of growth hormone and somatic growth**. Elsevier: Amsterdam; 1992. p.227-51.

LIN, T. et al. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary cultures. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 137, p. 950-956, 1986a.

LUCY, M.C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, p.1635-1647, 2000.

LUNSTRA, D.D.; FORD, J.J.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, v.46, n.4, p.1054-1062.1978.

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

MARTINELLI JÚNIOR, C.E. et al. Diagnóstico da Deficiência de Hormônio de Crescimento, a Rigor de IGF-1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p.27-33, fev. 2001.

MARTINELLI JUNIOR, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 5, p.717-725, 2008.

MAURAS, N. et al. Sex steroids, growth hormone, insulin-like growth factor-1: neuroendocrine and metabolic regulation in puberty. **Hormone Research**, v. 45, p. 74-80, 1996.

MELLADO, M.; et al. Effect of dietary energy intake and somatotropin administration after weaning on growth rate and semen characteristics of Granadina goat bucks. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**v. 36(4), p. 338-345, 2012.

MELO, M..I..V. **Desenvolvimento testicular e dinâmica da espermatogênese de búfalos mestiços de 10 a 24 meses de idade.**1991. 66f. Dissertação (Mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, 1991.

MOREIRA, P.S. A. et al. Somatotropina Bovina Recombinante (rbST) no desempenho e características corporais de bezerros mestiços alimentados em *creep-feeding*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p.1093-1097, 2002.

OHASHI, O. M. et al. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p.88-94, abr/jun. 2011.

OHASHI, O.M. **Estudos morfofisiológicos do testículo de búfalo mestiço (B. bubalis) em diferentes idades**. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) –Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.

OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D. Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 299-306, 2007.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Aspecto reprodutivo do macho bubalino. In: Vale, WG. (Coord.). **Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução**. Campinas, Brasil: Fundação Cargill. pp. 69-86. 1988.

OWENS, F.N.; BUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factors that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**, v.71, n.11, 1993.

PACHECO, A. et al. Avaliação da biometria testicular em Búfalos jovens criados na região Norte do Rio de Janeiro In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 15. 2005, Campo Grande-MS. **Anais...** Campo Grande, Congresso Brasileiro de Zootecnia 2005.

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

PETERS, J. P. Consequences of accelerated gain and growth hormone administration for lipid metabolism in growing beef steers. **Journal Nutri**. v. 116, p. 2490-2503. 1986.

PRADO, I.N.; NASCIMENTO, W.G.; NEGÃO, J.A. et al. Somatotropina bovina recombinante (rBST) nos aspectos hematológicos e metabólicos do sangue de novilhas (1/2 neloreX1/2 Red Angus) em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 465-472, 2003.

RAUSCH, M.I. The influence of level of feeding on growth and serum insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding proteins in growing beef cattle supplemented with somatotropin. **Journal Animal Science**. v. 80, p. 94–100. 2002.

ROCKENBACH, T. L. et al. **Efeitos da aplicação somatotropina (ST) no desenvolvimento reprodutivo de machos ruminantes e suínos**. Núcleo de Pesquisa, ensino e extensão em pecuária. Disponível em: www.ufpel.edu.br/nupeec. Acesso em: 23 jun 2013.

RODRIGUES, M. **Impacto da utilização da somatotropina bovina (bST) sobre a produção de leite e a avaliação genética de bovinos da raça Holandesa**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

RODRIGUES, L. et al. Somatotropina Bovina Recombinante (rbST) e Grupos Raciais Sobre a Precocidade Reprodutiva de Cabras. **Archives Of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p.9-15, 2010.

ROGOL, A.D. Growth at puberty: interaction of androgens and growth hormone. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 26, p. 767-770, 1994.

SÁ FILHO, M.F. **Efeito do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SANTOS, R.A. et al. Efeito de diferentes doses de somatotropina bovina (rBST) na produção e composição do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 25, n. 6, p. 1435-1445, 2001.

SANTOS, R.L. et al. Effect of growth hormone and induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. **Theriogenology**. v. 51, p. 975–984, 1999

SAUERWEIN, H. et al. Growth hormone treatment of breeding bulls used for artificial insemination improves fertilization rates. **Domestic Animal endocrinology**, v. 18, p. 145-158, 2000.

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

SILVA, D.M. et al. influência do IGF-I em características espermáticas do sêmen suíno descongelado. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19, 2010, Lavras. **Anais...** p. 1 - 4. 2010.

SIROTKIN, A.V. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. **Vet J.** v. 170, p. 307–317, 2004.

SJOGREN K. et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 7088-7092, 1999.

SOUSA, F.A. **Perfil eletroforético de proteínas e concentrações de leptina, insulina e igf-i do plasma seminal de tourinhos gir-leiteiros na peripuberdade.** 2011. 114f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SOUZA, L.W.O. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular.** 2004. 183f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, n.1-2, p. 9-13, 2002.

THISSEN, J. P.; KETELSLEGERS, J. M.; UNDERWOOD, L. E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocr. Rev.** v.15, p. 80–101,1994.

TONHATI, H et al. **Programa de Melhoramento Genético de Búfalos no Brasil: Estado da Arte.** I Simpósio da Cadeia Produtiva da Bubalinocultura, 11p., 2011.

UNDERWOOD, L.E.; VAN WYK, J.J. **Normal and aberrant growth**. In: Wilson JD, Foster DW, editores. *Willians – Textbook of endocrinology*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 1985. p. 155-205.

VALE, W. G. Application of reproductive techniques in buffalo. In *ASIAN BUFFALO CONGRESS ON SOCIAL ECONOMIC CONTRIBUTION OF BUFFALO TO RURAL AREAS*, 5, 2006. Nanning, China. **Proceedings...** Nanning. Abril 18 -22, v.1, p. 140–154.

VALE, W. G. et al. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.141-155, abr./jun. 2008.

VANELLI, B.G. et al. Insuline-like growth factor-I (IGF-I and IGF-I receptor in human testis: na immunohistochemical study. **Fertility and Sterility**, v. 49, p. 666-669, 1988.

VANN, R.C. et al. Recombinant bovine somatotropin (rbST) administration to creep fed beef calves increases muscle mass but does not affect satellite cell number or concentration of myosin light chain-1f m-RNA. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.76, p.1371-1379, 1998.

VELAYUDHAN, B. T., et al. Growth rate and changes of the somatotropic axis in beef cattle administered exogenous bovine somatotropin beginning at two hundred, two hundred fifty, and three hundred days of age. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 2866-2872, 2007

VELDHUIS J.D.; IRANMANESH A. Physiological regulation of the human growth hormone (GH) insulin-like growth factor type I (IGF-I) axis: predominant impact of age, obesity, gonadal function, and sleep. **Sleep**, v. 19, 1996. Suplemento.

VIEIRA, M.B. **influência da somatotropina recombinante bovina (rbst) sobre parâmetros metabólicos, hormonais e de qualidade de sêmen em touros**. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

VIEIRA, M. B. et al. efeito da somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre os níveis de IGF–I e insulina de touros. **Archives Of Veterinary Science**, v. 12, p.266-267, 2007. Suplemento.

WEST, G.B., BROWN, J.H. The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. **Journal Experimental Biology**. V. 208, p.1575-1592, 2005.

YAKAR, S. et al. Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density. **J. Clin. Invest**, v. 110, p. 771-781, 2002.