

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE
TOUROS DE DIFERENTES RAÇAS ZEBUÍNAS**

Paulo Antonio Terrabuio Andreussi

CAMPO GRANDE, MS
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE
TOUROS DE DIFERENTES RAÇAS ZEBUÍNAS**

Evaluation of spermatogenesis in zebu bulls

Paulo Antonio Terrabuio Andreussi

Orientador: Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS – 2013

PAULO ANTONIO TERRABUIO ANDREUSSI

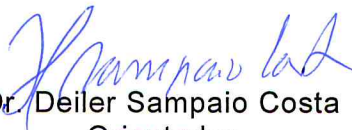
**“AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE TOUROS DE
DIFERENTES RAÇAS ZEBUÍNAS”**

“Evaluation Of spermatogenesis in zebu bulls”

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Doutor.

Área concentração: Produção Animal

APROVADA: 26/04/2013



Dr. Deiler Sampaio Costa
Orientador



Dra. Walvonvitis Baes Rodrigues



Dra. Juliana Corrêa Borges Silva



Dr. Gumercindo Loriano Franco



Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo

Dedico àqueles que diretamente, com atitudes altruístas, foram fundamentais para tornar possível esta conquista...

Ao Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa,

Ao Prof. Dr. Gumercindo Lorian Franco,

Ao Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges.

E àqueles que são a minha base de sustentação...

A toda minha família, em especial aos meus filhos, Carolina e Rafael.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas grandes obras operadas na minha vida; pelas portas que se abriram; pelas pessoas de boa atitude que estiveram ao meu lado; pelo vigor, coragem e sobriedade para vencer as vicissitudes impostas, pela paz de espírito; pela saúde, minha e dos meus; pela minha família.

Ao Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa, pela oportunidade, e pelo apoio que tornou esta caminhada possível e muito mais suave. As palavras não exprimem a grandeza do que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Gumercindo Loriani Franco, pelas enormes portas abertas, pela acolhida na pós-graduação, por tantas pequenas grandes coisas, como assinar meus documentos na ausência do meu orientador, pela convivência agradável, pelas palavras sempre muito bem vindas.

Ao Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges, por todas as portas abertas e pelo inestimável apoio.

Aos membros do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, das duas últimas gestões, pela oportunidade e inestimável auxílio.

Ao Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria, pelo apoio e orientação em inúmeras situações.

Ao Prof. Dr. Rafael De Rossi, pelo apoio e disposição em me orientar desde a época do mestrado.

Ao Prof. Dr. Valdemir Alves de Oliveira, pelo auxílio em várias situações.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos e toda a administração da Famez, pelo apoio dispensado.

Aos Professores Doutores Carlos Eurico dos Santos Fernandes e Ricardo Carneiro Brumatti, pela acolhida em suas disciplinas no doutorado.

À Prof^a. Dr^a. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, sempre disposta a ajudar, pela participação no exame de qualificação e correções realizadas.

À Prof^a. Dr^a. Sarah Alves Auharek, pela participação no exame de qualificação e pelas correções apropriadas.

Aos Doutores (as): Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, Gumercindo Lorian Franco, José Domingos Guimarães, Juliana Corrêa Borges Silva, Ricardo Carneiro Brumatti e Walvonvitis Baes Rodrigues, por gentilmente aceitarem participar desta banca.

Ao Dr. Walvonvitis Baes Rodrigues, por ter “movido montanhas” para poder participar desta banca.

Ao Prof. Dr. Eurípedes Batista Guimarães, pela convivência agradável. Nunca esquecerei de quando me mandava “estudar”.

À ex-secretária do extinto DMV, Izabel Valdes Batista, pelo incentivo e informações de outros cursos de doutorado, bem antes deste.

À Letícia Carvalho Gomes, secretária da Pós-graduação, pela gentileza, competência e auxílio prestado.

Ao Valdecir Marques Braga, da SECAD / FAMEZ, pela gentileza, auxílio sempre que precisei, e convivência agradável.

Ao pessoal do Laboratório de Diagnóstico por Imagem, pela convivência agradável e bons momentos de descontração.

Aos alunos da graduação, por compreenderem os momentos de sobrecarga.

A todos que, com grandes ou pequenas atitudes, colaboraram com a realização deste curso de doutorado.

...Muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 - Idade, peso corporal, peso testicular e do parênquima testicular, e índice gonadossomático (IGS) de touros de diferentes raças zebuínas.....	48
Tabela 2 - Proporção volumétrica (%) dos constituintes do parênquima testicular de touros de diferentes raças zebuínas.....	49
Tabela 3 - Diâmetro tubular (μm), altura do epitélio seminífero (μm), área da secção transversal de epitélio seminífero (μm^2), comprimento tubular por testículo (m) e comprimento tubular por grama de parênquima testicular (m) de touros de diferentes raças zebuínas.....	50

ARTIGO II

Tabela 1 - População dos diferentes tipos celulares por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros de diferentes raças zebuínas.....	66
Tabela 2 - Razões entre números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros de diferentes raças zebuínas.....	67
Tabela 3 - Percentual de perdas celulares durante as divisões das células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros de diferentes raças zebuínas.....	68
Tabela 4 – Razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, de touros de diferentes raças zebuínas (por secção transversal de túbulos seminíferos).....	68
Tabela 5 – Produção espermática diária total ($\times 10^9$) e por grama de parênquima testicular ($\times 10^6$) de touros de diferentes raças zebuínas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Espermátide arredondada
CES	Ciclo do epitélio seminífero
cm	Centímetros
DP	Desvio padrão
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Grama
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IGS	Índice gonadossomático
IGF-I	Fator do Crescimento Semelhante à Insulina tipo I
kg	Kilograma
LH	Hormônio Luteinizante
µm	Micrômetro
m	Metro
mm	Milímetro
PAS	Periodic acid-Schiff
PL/L	Espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno
PO	Puro de origem
PQ	Espermatócito primário em paquíteno
S	Célula de Sertoli
Sptg A	Espermatogônia do tipo A
TCG	Total de células germinativas

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a eficiência da espermatogênese através da morfometria do parênquima testicular, assim como alguns parâmetros da histologia quantitativa testicular em touros de diferentes raças zebuínas. Utilizaram-se fragmentos testiculares de touros das raças Nelore (n=10), Nelore Mocho (n=6), Gir (n=5), Guzerá (n=5) e Tabapuã (n=5). Os fragmentos foram fixados por perfusão tecidual com solução de Karnovsky, incluídos em glicol metacrilato e corados com azul de toluidina – borato de sódio 1%. Animais da raça Nelore apresentaram maior população de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (38,30) e em paquíteno (38,14) e espermatídes arredondadas (113,30), maior rendimento das mitoses espermatogoniais (21,2), maior produção espermática diária por grama de parênquima testicular ($32,8 \times 10^6$), maior proporção volumétrica tubular (85,2%) e maior altura do epitélio seminífero (73,2 μm) que aqueles das raças Gir, Guzerá e Tabapuã. Apresentaram também maior rendimento geral da espermatogênese (62,4) que os das raças Gir e Tabapuã, e maior proporção volumétrica de células de Leydig (5,2%) que os animais das raças Guzerá e Tabapuã. Não houve diferença significativa em qualquer dos parâmetros avaliados entre as raças Nelore e Nelore Mocho. O índice de células de Sertoli, o índice gonadossomático, o diâmetro médio de túbulo seminífero, a área de secção transversal de túbulo seminífero e o comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular não variaram entre as raças estudadas. Aparentemente a seleção genética aplicada às raças tem melhorado o rendimento do processo espermatogênico pela melhoria de alguns parâmetros morfométricos testiculares e diminuição das perdas celulares, porém, não aumentou a capacidade de suporte das células de Sertoli.

Palavras-chave: Espermatogênese. Bovino. Testículo. Produção espermática diária. Proporção volumétrica tubular.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of the spermatogenesis and some parameters of quantitative testicular histology in bulls of different zebu breeds. We used testicular fragments from sexually mature Nelore (n=10), Polled Nelore (n=6), Gyr (n=5), Guzarat (n=5) and Tabapuã (n=5) bulls. The tissue was perfused with Karnovsky solution, included in glycol methacrylate and stained with toluidine blue – sodium borate 1%. Nelore bulls presented higher population of primary spermatocyte in preleptotene/leptotene (38.30) and in pachytene (38.14) and round spermatids (113.30), higher yield of spermatogonial mitosis (21.2), higher daily spermatid production per gram of testicular parenchyma (32.8×10^6), higher volumetric proportion tubular (85.2%), and higher height of seminiferous epithelium (73.2 μm) than Gyr, Guzarat and Tabapuã bulls. They also showed higher general spermatogenic yield (62.4) than Gyr and Tabapuã bulls, and higher volumetric proportion of Leydig cells (5.2%) than Guzarat and Tabapuã bulls. There was no significant difference in any evaluated parameters between Nelore and Polled Nelore bulls. The Sertoli cells index, gonadosomatic index, tubular diameter, the cross-sectional area of seminiferous tubule and tubular length total and per gram of testicular parenchyma not vary among breeds. Apparently the genetic selection applied to the breeds has been improving the yield in the spermatogenic process by improving some morphometric parameters and decreasing cellular loss, although, it did not increase the support capacity of the Sertoli cells.

Keywords: Spermatogenesis. Bovine. Testis. Daily spermatid production. volumetric proportion tubular.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Revisão da literatura.....	17
1.1.1 Os testículos.....	17
1.1.2 Espermatogênese.....	18
1.1.3 O Ciclo do epitélio seminífero.....	20
1.1.4 A onda do epitélio seminífero.....	21
1.1.5 Estádio do ciclo do epitélio seminífero.....	22
1.1.6 As células de Sertoli.....	23
1.1.7 Espermatogônias.....	25
1.1.8 Espermatócitos.....	26
1.1.9 Espermátides.....	27
1.1.10 As células de Leydig.....	29
1.2 Objetivos.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
2 ARTIGO I: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO TESTÍCULO DE TOUROS DE RAÇAS ZEBUÍNAS.....	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
2.1 INTRODUÇÃO.....	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.2.1 Animais, colheita dos testículos e aferição da biometria testicular.....	45
2.2.2 Processamento histológico.....	46
2.2.3 Peso do parênquima testicular e índice gonadossomático.....	46
2.2.4 Proporção volumétrica dos constituintes do parênquima testicular.....	46
2.2.5 Diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e área da secção transversal.....	47
2.2.6 Comprimento total dos túbulos seminíferos e por grama de parênquima testicular.....	47
2.2.7 Análise estatística.....	48

2.3 RESULTADOS.....	48
2.4 DISCUSSÃO.....	51
2.5 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	55
3 ARTIGO II: EFICIÊNCIA DA ESPERMATOGÊNESE DE TOUROS <i>Bos</i> <i>taurus indicus</i>	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
3.1 INTRODUÇÃO.....	61
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.2.1 Animais, colheita dos testículos e aferição da biometria testicular.....	62
3.2.2 Processamento histológico.....	63
3.2.3 População celular dos túbulos seminíferos (no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero).....	63
3.2.4 Rendimento intrínseco da espermatogênese.....	64
3.2.5 Percentual de perdas durante as divisões celulares.....	64
3.2.6 Índices de células de Sertoli.....	65
3.2.7 Cálculo da produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular.....	65
3.2.8 Análise estatística.....	65
3.3 RESULTADOS.....	65
3.4 DISCUSSÃO.....	69
3.5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Até o século XVIII o rebanho bovino brasileiro era formado por animais mestiços e de raças europeias trazidas pelos colonizadores, que, encontrando condições adversas de clima e intolerância aos endo e ectoparasitas, apresentavam baixa produtividade. Nesta época, os zebuínos eram animais exóticos, e adquiridos em zoológicos. Na segunda metade do século XIX e início do século XX o Brasil alcançou grande impulso na produtividade da pecuária de corte com o aumento na produção de mestiços e formação dos primeiros plantéis de zebuínos puros, a partir de animais importados da Índia (SANTIAGO, 1983; SANTOS, 1998).

O Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais de bovinos do mundo, atingindo no ano de 2010 um efetivo com mais de 209,5 milhões de animais, com aumento de 2,1% em relação ao ano de 2009 (IBGE, 2010). Estima-se que cerca de 80% deste efetivo seja composto por animais de raças zebuínas e seus mestiços (BERGMANN, 1993), evidenciando sua grande adaptabilidade às condições ambientais e sua importância no cenário nacional.

Segundo estimativas aproximadas, no Brasil, apenas 10% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas artificialmente (ASBIA, 2011), com a maioria dos acasalamentos sendo realizados por monta natural, reforçando a importância da atenção dispensada à fertilidade dos touros.

É importante ressaltar que a influência do reprodutor não se limita a fornecer metade dos genes de seus descendentes. Devido ao fato de que um touro, durante a estação reprodutiva, pode servir grande número de fêmeas, o mesmo seria responsável por 70% ou mais do melhoramento genético obtido nas características de uma população (GEYMONAT; MÉNDEZ, 1987). Portanto, a seleção dos touros de raças zebuínas é uma decisão estratégica que afeta diretamente o desempenho reprodutivo e a lucratividade da pecuária brasileira (COE; GIBSON, 1993).

Inicialmente, os touros de raças zebuínas destacavam-se pela rusticidade e adaptabilidade às condições brasileiras, entretanto, relatavam-se seu desenvolvimento bem mais tardio em relação às raças europeias. Vale Filho, Pinheiro e Basrur (1986), relataram que os zebuínos atingem a maturidade sexual 12 a 18 meses mais tarde do que os taurinos. Porém, desde a década de 70 alguns pesquisadores já identificavam rebanhos mais precoces. Garcia (1971), por

exemplo, registrou na raça Nelore 89,4% de animais sexualmente maduros aos 24 meses de idade.

Atualmente, devido ao empenho conjunto de pesquisadores, criadores e associações de raças zebuínas, tem-se percebido um grande avanço no melhoramento genético destas raças, o que tem encurtado a distância entre os índices produtivos das raças zebuínas em relação às europeias. Este efeito pode ser percebido, por exemplo, no estudo de Vasconcelos (2001), que trabalhando com rebanho Nelore puro de origem, relatou que aos 20 a 22 meses de idade os touros já apresentavam maturidade sexual, ressaltando que, inclusive os animais criados em regime extensivo podem se mostrar precoces, desde que o rebanho seja selecionado para tal característica. Resultados semelhantes foram observados por Brito et al. (2004) em animais da raça Nelore criados extensivamente, que apresentaram maturidade sexual, em média, aos 23,8 meses.

Martins (2010), ao trabalhar com animais da raça Gir leiteiro suplementados em sistema intensivo, observou maturidade sexual (no mínimo 70% de espermatozoides normais com menos de 15% de defeitos espermáticos maiores) entre 18,7 a 20,5 meses de idade. Percebe-se ainda, um sinal evidente deste melhoramento da população zebuína pelos dados de perímetro escrotal observados nas décadas de 70-80 e os relatos mais atuais. Cardoso (1981), trabalhando com touros Nelore de 59 meses de idade, relatou perímetro escrotal médio de 32,9 cm, valores que na tabela de classificação andrológica de touros *Bos indicus* adotada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, já eram considerados questionáveis para animais acima de 48 meses (FONSECA; SANTOS; MALINSKI, 1997).

O perímetro escrotal é uma medida biométrica importante para o prognóstico do futuro reprodutivo de touros, possui alta herdabilidade, é de fácil mensuração e alta repetibilidade, o que tem viabilizado sua utilização como um dos parâmetros de seleção de touros (COULTER; FOOTE, 1979; GARCIA DERAGON; LEDIC, 1990). Além disso, existe alta correlação entre o perímetro escrotal e a produção de gametas, precocidade sexual, características de produção (WOLF; ALMQUIST; HALE, 1965), peso corporal e idade (NEVES, 2007).

Maciel et al. (1987) mediram o perímetro escrotal de 1.528 touros da raça Nelore criados em regime extensivo, com idades de 24, 30, 36, 48, 60 e 120 meses e obtiveram os seguintes valores: $28,2 \pm 2,1$; $29,7 \pm 2,6$; $31,1 \pm 3,2$; $32,9 \pm 3,2$; $33,8 \pm 3,3$ e $35,7 \pm 3,0$ cm, respectivamente, valores semelhantes aos relatados por

Rocha et al. (1982). Já na década de 90, Martins Filho e Lôbo (1991) observaram perímetro escrotal de 31 cm em animais da raça Nelore criados em regime extensivo e com média de idade de 20 meses.

Em virtude do melhoramento genético que tem sido realizado no Brasil, estudos recentes tem apresentado maiores valores de perímetro escrotal, principalmente na raça Nelore. Vasconcelos (2001) observou perímetro escrotal com média de 32,0 cm em animais puros de origem e registrados em livro aberto da raça Nelore, criados extensivamente, com 20 a 22 meses de idade. Viu et al. (2006), relataram média de 30,0 cm aos 17 a 20 meses e 33,2 cm aos 21 a 25 meses de idade na raça Nelore, e Neves (2007), 31,9 cm entre 18 e 24 meses, também em animais da raça Nelore. Entre outras raças de zebuínos, Corrêa et al. (2006) observaram perímetro escrotal médio de 30,6 cm em animais da raça Tabapuã, criados a pasto, com idade de 21 a 27 meses, e Martins (2010), perímetro escrotal de 30,5 cm em animais da raça Gir leiteiro aos 20 meses de idade. No entanto, valores inferiores foram observados por Pacheco et al. (2007), em animais da raça Guzerá (29,0 cm com 24 meses de idade) e Osório (2010), em animais Guzerá registrados em livro aberto (25,7 cm com 20 a 24 meses de idade).

Silva (1997) ressaltou que a busca de reprodutores com maior perímetro escrotal tem conduzido à seleção de formas testiculares mais ovaladas, ou mesmo esféricas, e rejeitando animais com testículos de forma alongada, privilegiando apenas o perímetro em detrimento do volume testicular. Dentro deste contexto, Bailey, Monke e Hudson (1996) afirmaram que somente o perímetro escrotal não constitui medida representativa da produção espermática e, portanto, do potencial reprodutivo dos machos. Segundo estes autores, os testículos mais longos, como frequentemente encontrados em raças zebuínas, apresentam maior superfície de contato com o meio ambiente, o que facilita a termorregulação, melhorando a qualidade do sêmen.

Apesar da medida do perímetro escrotal ser um parâmetro valioso na seleção de touros, Bertschinger et al. (1992), verificaram que machos com elevado perímetro escrotal podem apresentar ejaculados com baixa motilidade e elevado percentual de espermatozoides anormais. Sugere-se que na seleção de reprodutores, deve-se considerar o volume testicular, além do perímetro escrotal (UNANIAN et al., 2000).

Como a grande maioria dos programas de melhoramento genético utiliza o perímetro escrotal como principal parâmetro para seleção de touros para

reprodução, tem-se selecionado animais com maior produção espermática e maior volume testicular, o que implica diretamente em alterações na morfologia funcional deste órgão, justificando a necessidade de atualizações periódicas destas mensurações para se evidenciar a progressão dos índices morfométricos do parênquima testicular.

Apesar da grande importância dos animais das raças zebuínas na pecuária nacional, alguns fundamentos básicos da fisiologia reprodutiva dos machos destas raças ainda não estão totalmente esclarecidos. Em relação ao processo espermatogênico de animais zebuínos, existem poucos artigos publicados, destacando-se o trabalho de Cardoso em 1981, que fez uma descrição detalhada da cinética e quantificação da espermatogênese em touros Nelore, destacando que: a duração média do ciclo do epitélio seminífero foi de $14 \pm 0,39$ dias, e que os túbulos seminíferos ocupavam $81,4 \pm 0,4\%$ do parênquima testicular. Destacou ainda, que o diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi de $232,7 \pm 6,4 \mu\text{m}$, que cada grama de parênquima testicular apresentava em média 13,87 metros de túbulos seminíferos, que o coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais foi de 15,01; equivalendo a um percentual de perdas de 75,6%, que o rendimento meiótico foi de 2,94; e que cada espermatogônia do tipo A produziu, em média, 44,34 espermátides alongadas, ocorrendo, portanto, 82,6% de perdas durante todo o processo espermatogênico.

O desenvolvimento testicular de touros Nelore já havia sido descrito por Cardoso em 1977, e mais recentemente, Aponte, De Rooij e Bastidas (2005) descreveram o desenvolvimento testicular de touros Brahman, com 8,5 a 19 meses de idade, utilizando técnicas histomorfométricas, entretanto, são raras as publicações que fazem uma abordagem morfológica e funcional do processo espermatogênico nas outras raças zebuínas.

A análise histológica quantitativa da espermatogênese pode ser utilizada no estabelecimento de padrões cinéticos celulares como a divisão e renovação de espermatogônias; na quantificação numérica das células germinativas e de Sertoli; para estimar a capacidade de suporte das células de Sertoli nas várias etapas ao longo do processo espermatogênico; no cálculo do rendimento da espermatogênese em suas várias etapas (CASTRO; BERNDTSON; CARDOSO, 1997); e ainda, permite estimar a produção espermática diária a partir da contagem de espermátides

arredondadas (AMANN, 1981; JOHNSON et al., 2000). Estes padrões fornecem ainda, subsídios para o conhecimento de uma gama de particularidades da biologia reprodutiva das diferentes espécies (FAWCETT; NEAVES; FLORES, 1973), e parâmetros para o estudo dos efeitos de fármacos e tóxicos no processo espermatogênico (CASTRO; BERNDTSON; CARDOSO, 1997).

A proporção volumétrica das células de Leydig no tecido intertubular e os parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, tais como o diâmetro tubular, a espessura do epitélio seminífero e o comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular apresentam uma relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações para o estabelecimento da mesma em uma dada espécie e constituindo indicadores desta atividade em investigações envolvendo a função testicular (FRANÇA; RUSSELL, 1998; PAULA; FRANÇA; GARCIA, 1999).

Apesar de o processo espermatogênico de touros Nelore ter sido muito bem descrito por Cardoso (1981), já se passaram muitos anos de melhoramento genético aplicados nesta raça, portanto, é aceitável que alguns resultados obtidos por aquele pesquisador já tenham sido superados, como por exemplo, o rendimento intrínseco da espermatogênese, a produção espermática diária, a proporção dos constituintes do parênquima testicular, a altura do epitélio seminífero e o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

Por outro lado, são escassas as publicações descrevendo o processo espermatogênico de touros das outras raças zebuínas, que apesar de ter menor contribuição no efetivo total de bovinos do que a raça Nelore, são raças que participam efetivamente deste contexto, principalmente em cruzamentos com raças europeias. Não foi encontrado qualquer artigo que tivesse realizado uma análise comparativa do processo espermatogênico de touros de diferentes raças zebuínas na literatura consultada, fato que motivou a realização desta pesquisa.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Os testículos

Os testículos desenvolvem-se a partir de protuberâncias do epitélio celômico no aspecto ventral do mesonefro. Estas protuberâncias, conhecidas como cristas genitais, são invadidas por células germinativas primordiais que se desenvolvem a partir de células do endoderma do saco vitelino e migram através do mesênquima para a área lateral da aorta dorsal e ventral aos ductos mesonéfricos (GIER; MARION, 1970). Nos bovinos, as células germinativas primordiais podem ser encontradas nas cristas gonadais aos 26 dias de gestação, onde se organizam, juntamente com células de sustentação, para originar os cordões sexuais primários e, posteriormente, os túbulos seminíferos (GIER; MARION, 1970; CARDOSO, 1977). Ao se localizarem no interior dos cordões sexuais primários as células germinativas primordiais passam a ser chamadas de gonócitos. Após a formação dos cordões seminíferos, o tecido mesenquimal que os envolve é invadido por uma rede vascular, dando origem ao compartimento intertubular.

Pode-se observar a presença de um pequeno testículo em embriões com 27 a 31 dias de vida (WROBEL; SÜB, 1998; JACOMINI et al., 2007). A túnica albugínea recobre a massa de túbulos seminíferos aproximadamente no 40º dia de gestação (GIER; MARION, 1970). A gônada diferenciada pode ser reconhecida de 38 (JACOMINI et al., 2007) a 42 dias de gestação (MOUSTAFA; HAFEZ, 1971) e a migração dos testículos para a bolsa escrotal ocorre bem antes do nascimento, atingindo o anel inguinal aos 100-105 dias e alcançando a bolsa escrotal aos 140 dias de vida (GIER; MARION, 1970).

Os testículos são glândulas mistas que possuem duas funções distintas: uma endócrina de produzir esteróides e outra exócrina produzindo gametas masculinos. Esta última, denominada de espermatogênese, tem seu início, manutenção e controle determinados pela ação conjunta, principalmente da testosterona, hormônio produzido pelas células de Leydig no próprio testículo, e do hormônio folículo estimulante (FSH) produzido na adenohipófise (SHARPE, 1994; FREEMAN; ROMMERTS, 1996). Os testículos estão envoltos pela túnica albugínea que é recoberta externamente pela lâmina visceral da túnica vaginal. A túnica albugínea é uma cápsula rica em fibras colágenas e tecido conjuntivo denso, que emite septos

para o interior do órgão (mediastino testicular) e o subdivide em lóbulos. Cada lóbulo contém diversos túbulos seminíferos imersos em tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos, nervos e as células de Leydig (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). A túnica vaginal é constituída por tecido conjuntivo frouxo, derivado do peritônio, que se mescla imperceptivelmente com o tecido conjuntivo denso da túnica albugínea (BANKS, 1992; HOSKEN, 1997).

O parênquima testicular dos mamíferos é constituído morfofuncionalmente por dois compartimentos: (a) o compartimento intersticial ou intertubular, também chamado de espaço intertubular, é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras de tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e pelas células de Leydig, que são responsáveis pela produção de esteróides (b) o compartimento tubular, onde os espermatozóides são produzidos e se encontram os túbulos seminíferos, que são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria encontram-se as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e as fibras colágenas. No epitélio seminífero estão presentes as células de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica. No lume tubular encontra-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides (RUSSELL et al., 1990; COSTA; PAULA, 2003).

1.1.2 Espermatogênese

Espermatogênese é um complexo processo biológico de transformação celular pelo qual as espermatogônias, células-tronco diplóides da linhagem germinativa, se diferenciam gradativamente até células haplóides altamente especializadas, os espermatozóides.

Ao nascimento, os cordões seminíferos dos testículos de mamíferos contém células germinativas chamadas gonócitos, localizadas no centro dos cordões seminíferos e mantidos na fase G_0 do ciclo celular (McGUINNESS; ORTH, 1992; DE ROOIJ; RUSSELL, 2000). Atualmente, em ratos, são reconhecidos três tipos de gonócitos, tipo I, II e III, que se diferenciam entre si pela morfologia, número e posicionamento dentro dos cordões seminíferos (DRUMOND; MEISTRICH; CHIARINI-GARCIA, 2011). Após o nascimento, os gonócitos se deslocam em direção à membrana basal e iniciam sua proliferação, dando origem, após várias

etapas, às espermatogônias tronco adultas (McGUINNESS; ORTH, 1992; DE ROOIJ; RUSSELL, 2000).

O processo espermatogênico envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermatídes, podendo ser dividido em três fases distintas, nos mamíferos, a partir da puberdade: a espermatogonial ou mitótica, a espermatocitária ou meiótica e a espermiogênica ou de diferenciação, cada uma caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular (COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS; ORTAVANT, 1970; CLERMONT, 1972; SHARPE, 1994), e duram aproximadamente 21, 23 e 17 dias, respectivamente (JOHNSON et al., 2000).

A fase espermatogonial ocorre a partir de divisões mitóticas das espermatogônias, iniciando pelas espermatogônias tronco, até a formação dos espermatócitos primários, a fase espermatocitária ou meiótica envolve divisões reducionais dos espermatócitos, resultando na formação de células haplóides, as espermatídes; a fase espermiogênica desenvolve-se a partir de uma complexa série de alterações morfológicas e funcionais das espermatídes até sua liberação para o lúmen do túbulo seminífero, quando passam a ser espermatozóides (CLERMONT, 1972; ORTAVANT; COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS, 1977).

As células germinativas normalmente sofrem perdas durante a espermatogênese, principalmente durante a fase espermatogonial e meiótica (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005), o que impede que o rendimento da espermatogênese seja 100%. Desta forma, uma espermatogônia A_1 não vai gerar necessariamente 64 espermatócitos primários e 256 espermatídes, como teoricamente seria esperado nos animais com seis gerações espermatogônicas (COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS; ORTAVANT, 1970; CLERMONT, 1972). Esta perda celular ocorre por apoptose e degeneração das células germinativas, principalmente durante a multiplicação das espermatogônias e divisões reducionais de espermatócitos (AMANN, 1962; JOHNSON, 1986a; HESS; FRANÇA, 2005), não ocorrendo de forma apreciável durante a espermiogênese em touros (AMANN, 1970), de forma que uma espermatíde normalmente vai gerar um espermatozóide.

O processo espermatogênico é único no corpo e dura de 30 a 75 dias na maioria dos mamíferos estudados (RUSSELL et al., 1990; JOHNSON, 1991; FRANÇA; RUSSELL, 1998; FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Cerca de 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que o processo espermatogênico

se complete em mamíferos, sendo que, nos bovinos a espermatogênese tem duração de 61 dias (AMANN; SCHANBACHER, 1983). Em estudo de Cardoso (1981), a duração de um ciclo do epitélio seminífero em bovinos foi de $14 \pm 0,39$ dias, concluindo-se que a espermatogênese teve duração de aproximadamente 63 dias.

1.1.3 O Ciclo do epitélio seminífero

O epitélio seminífero é composto, além das células de Sertoli, por uma geração de espermatogônias vistas ao longo da membrana basal, por uma ou duas gerações de espermatócitos e por uma ou duas gerações de espermátides localizadas no limite para o lúmen tubular. Estas células, encontradas no epitélio seminífero de forma organizada, proporcionam arranjos celulares definidos que caracterizam os estádios, que se sucedem com o tempo de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero. Portanto, ao longo do tempo ocorrem mudanças constantes e cíclicas das associações celulares em uma dada secção transversal do túbulo seminífero (ROOSEN-RUNGE; GIESEL JUNIOR, 1950; LEBLOND; CLERMONT, 1952; FRANÇA, 1991). Assim, o ciclo do epitélio seminífero é a série de eventos celulares que ocorrem em uma dada área do epitélio seminífero entre dois aparecimentos sucessivos da mesma associação celular (CLERMONT, 1972; BERNDTSON, 1977; RUSSELL et al., 1990). Na maioria dos mamíferos estudados o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentado e normalmente existe apenas um estágio por secção transversal de túbulo em dado momento (LEBLOND; CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). Exceção é feita para humanos (AMANN, 1981) e aves (LIN; JONES, 1990), nos quais aparecem mais de um tipo de associação celular por secção transversal de túbulo seminífero.

Estudos tem indicado que as células de Sertoli exercem um papel central na coordenação dos ciclos e ondas do epitélio seminífero. A avaliação da expressão de genes e outras proteínas em vários locais do epitélio seminífero, inclusive células de Sertoli e germinativas, em testículos em fase inicial de desenvolvimento e maduros, indicaram que a sinalização dos mecanismos que coordenam os ciclos e ondas do epitélio seminífero, ocorre desde as primeiras fases do desenvolvimento tubular, mesmo antes das diferenciações das células germinativas, quando observam-se

apenas gonócitos e algumas poucas células germinativas imaturas nos cordões espermáticos, reforçando a importância das células de Sertoli neste contexto (TIMMONS; RIGBY; POIRIER, 2002).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é considerada uma constante biológica espécie-específica que está sob controle do genótipo das células germinativas (FRANÇA et al., 1998) e compreende, em dias, 8,6 no suíno, 10,4 no carneiro, 12,2 no cavalo, 13,5 no touro e 16,0 no homem (CLERMONT, 1963; SWIERSTRA; GEBAUER; PICKETT, 1974; AMANN, 1981; AMANN; SCHANBACHER, 1983).

O conhecimento do ciclo do epitélio seminífero é fundamental para o completo entendimento e utilização das técnicas para quantificar a espermatogênese (BERNDTSON, 1977).

1.1.4 A onda do epitélio seminífero

Perey, Clermont e Leblond (1961) denominaram de onda do epitélio seminífero a modificação sequencial dos estádios do ciclo do epitélio ao longo da extensão do túbulo seminífero, ou seja, um determinado estágio está em posição contígua a um segmento em estágio subsequente. Porém, existe a possibilidade de irregularidades na expressão da ordem das fases consecutivas da onda do epitélio seminífero, a esta alteração é dado o nome de modulação.

A onda envolve uma sequência de estádios, iniciando-se com os menos avançados no meio da alça, até os progressivamente mais evoluídos e mais próximos da *rete testis* (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Como o túbulo seminífero apresenta duas extremidades conectadas à *rete testis* e em ambas é iniciada uma sequência decrescente, é esperado que em algum ponto, ao longo deste túbulo, haverá o encontro destas duas sequências. Este ponto é denominado sítio de reversão e é encontrado muito próximo ao ponto médio do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990).

Funcionalmente a onda do epitélio seminífero tem como objetivos: reduzir a competição por hormônios e metabólicos usados em um dado estágio; a liberação constante de espermatozoides no túbulo; reduzir a congestão ao longo do túbulo seminífero; manter constante o fluxo de fluidos para transporte de espermatozoides e hormônios; manter um fluxo constante de espermatozoides e hormônios para o

epidídimo, favorecendo, assim, a maturação dos espermatozóides (JOHNSON, 1991).

1.1.5 Estádio do ciclo do epitélio seminífero

Nos túbulos seminíferos de indivíduos sexualmente maduros, as células germinativas não estão organizadas ao acaso, e sim em associações celulares especiais denominadas estádios, estes se encontram arranjados de forma cíclica, permitindo, na maioria das espécies, um único estágio por secção transversal do túbulo seminífero (LEBLOND; CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). A divisão do ciclo do epitélio seminífero em estádios é um artifício para representar as diferentes associações celulares que ocorrem naturalmente (JOHNSON et al., 2000).

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (BERNDTSON, 1977; FRANÇA; RUSSELL, 1998) e pelo método do sistema acrossômico (LEBLOND; CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). No primeiro, oito estádios do ciclo são sempre obtidos para todas as espécies, e se baseia nas alterações de forma do núcleo das células espermatogênicas, na ocorrência de divisões meióticas e no arranjo das espermátides no epitélio seminífero (COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS; ORTAVANT, 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT; COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS, 1977). No segundo, o número de estádios é arbitrário e varia de 10 a 16 nas espécies já investigadas até o momento, baseia-se nas alterações do sistema acrossômico e na morfologia das espermátides em desenvolvimento (RUSSELL et al., 1990; CASTRO, 1995; FRANÇA; RUSSELL, 1998; FRANÇA; BECKER-SILVA; CHIARINI-GARCIA, 1999). Neste, o ciclo dos bovinos foi dividido em 12 estádios (BERNDTSON; DESJARDINS, 1974).

A frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é considerada uma constante relativa entre indivíduos de uma mesma espécie, porém varia entre espécies (SWIERSTRA, 1968; OKWUN et al., 1996), sendo um parâmetro de fundamental importância nos estudos da espermatogênese refletindo a duração absoluta de cada estágio, e essencial para estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero (CASTRO; BERNDTSON; CARDOSO, 1997).

1.1.6 As células de Sertoli

As células de Sertoli localizam-se junto à lâmina basal dos túbulos seminíferos, e seu citoplasma envolve as células germinativas e estende-se até o lume tubular. Estas células são os elementos somáticos do epitélio seminífero (LEBLOND; CLERMONT, 1952) e estão presentes em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero (BILASPURI; GURAYA, 1984, 1986).

A região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* é revestida por células de Sertoli com poucas espermatogônias. As células de Sertoli presentes nesta região apresentam diferenças em quantidades e organização de suas organelas citoplasmáticas, altura das células e aparência dos núcleos em relação às demais células de Sertoli maduras, estes, semelhantes aos observados em células imaturas de testículos em desenvolvimento. Nesta região, o citoplasma das células de Sertoli forma processos filamentosos dispendo-se como válvulas no lume tubular. Consideram-se que as mesmas regulam o fluxo de fluidos dos túbulos seminíferos para a *rete testis* (HESS; FRANÇA, 2005). O aspecto morfológico destas células, semelhante às imaturas, tem despertado o interesse de pesquisadores, pelo seu possível potencial de multiplicação após a puberdade, em algumas espécies (MIRANDA, 2006).

As células de Sertoli tem o importante papel de regular a espermatogênese (RUSSELL; GRISWOLD, 1993), já que intermediam a ação da testosterona e do FSH nos testículos, de forma a ser responsável pelo início, manutenção e regulação deste processo (SHARPE, 1994).

Suas funções podem ser separadas em duas épocas distintas: Na idade fetal, estas células são responsáveis pela regressão dos ductos de Muller através da secreção do hormônio anti-Mulleriano (MACKAY, 2000). Durante a puberdade ocorre maturação funcional destas células, quando perdem a capacidade de multiplicação e formam as junções celulares entre células de Sertoli (SHARPE et al., 2003), assumindo funções na espermatogênese que inclui, entre outras, o suporte estrutural e nutricional das células germinativas em desenvolvimento; a compartimentalização do túbulo seminífero pelas junções entre as células de Sertoli, propiciando um ambiente protegido e especializado para as células germinativas em desenvolvimento; a progressão das células germinativas em direção ao lúmen tubular; a secreção de fluidos e proteínas; a fagocitose das células germinativas

degeneradas e do excesso do citoplasma remanescente da liberação do espermatozóide (RUSSELL et al., 1990).

As junções entre as células de Sertoli adjacentes formam a barreira hematotesticular, que divide funcionalmente o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal e o adluminal. A divisão e proliferação das espermatogônias até espermatócitos primários em pré-leptóteno ocorrem no compartimento basal, ou seja, abaixo das junções entre as células de Sertoli adjacentes. No início da fase de leptóteno da primeira divisão meiótica, os espermatócitos primários migram através da barreira hematotesticular para o compartimento adluminal, onde a meiose continua e a espermiogênese ocorre (DYM, 1973; RUSSELL, 1977; RUSSELL; PETERSON, 1985).

Neste contexto, a barreira hematotesticular possui atividade altamente dinâmica, uma vez que abre-se periodicamente para permitir a migração destas células sem expor o ambiente do compartimento adluminal ao sistema imunológico (WONG et al., 2005; YAN; CHENG, 2005). Desta forma, a barreira criada pelas células de Sertoli isola as células em meiose e pós-meiose em um microambiente privilegiado, protegendo-as de agressões que poderiam ocorrer pelo sistema imunológico (WAITES; GLADWELL, 1982). Além da barreira hematotesticular, estas células são responsáveis pela produção local de citocinas imunossupressoras e fatores proapoptóticos, exercendo além da proteção contra a agressão imunológica, o controle da produção de células germinativas, eliminando aquelas defeituosas e controlando a produção excessiva de espermatócitos em pré-leptóteno (DETIN et al., 2003). Em adição, outros estudos apontam para uma possível atuação das células endoteliais e peritubulares na restrição da entrada de substâncias nos testículos (SETCHELL, 2008).

As células no compartimento basal recebem suprimento hormonal diretamente da rede de capilares sanguíneos ou do fluido intertubular, enquanto aquelas que se encontram no compartimento adluminal o fazem através das células de Sertoli que estabelecem junções especiais com estas células (GURAYA, 1987).

As células de Sertoli apresentam uma capacidade relativamente fixa de suporte das células germinativas de maneira espécie-específica (RUSSELL; PETERSON, 1984; FRANÇA; RUSSELL, 1998). Seu número total por testículo, estabelecido durante o desenvolvimento testicular, está relacionado com o tamanho do testículo e com a produção espermática do animal (ORTH; GUNSALUS;

LAMPERTI, 1988; SHARPE, 1994). Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli multiplicam-se por mitose, porém após a puberdade estas células não sofrem mais divisões, mantendo sua população estável (COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS; ORTAVANT, 1970; SHARPE, 2003).

Considerando esta estabilidade numérica das células de Sertoli após a puberdade e o fato destas serem menos susceptíveis a agentes deletérios quando comparadas às células germinativas (KUMI-DIAKA et al., 1983), o rendimento da espermatogênese pode ser avaliado a partir da estimativa da população de células germinativas em relação à população de células de Sertoli (BERNDTSON; IGBOELI; PICKETT, 1987; JOHNSON et al., 2000). A eficiência da espermatogênese aumenta progressivamente a partir da puberdade até ocorrer a maturidade sexual, quando a razão entre células de Sertoli e células espermatogênicas se estabiliza. Exceção é feita no caso dos equínos, nos quais se observam efeito sazonal, com maior número de células de Sertoli durante a estação reprodutiva (JOHNSON, 1986b).

1.1.7 Espermatogônias

Russell et al. (1990), relataram existir três tipos de espermatogônias: as espermatogônias tronco (A_s), as espermatogônias em diferenciação (A_{pr} , A_{al}) e as espermatogônias diferenciadas ($A_1 - A_4$, intermediária e B).

Já De Rooij (1998), classificou estas células em duas categorias básicas: espermatogônias indiferenciadas (imaturas) e diferenciadas (maturas). À primeira categoria pertencem as espermatogônias isoladas A_s ("single"), pareadas A_{pr} ("paired") e alinhadas A_{al} ("aligned"). Já as espermatogônias do tipo A, intermediárias (In) e do tipo B pertencem à categoria das espermatogônias diferenciadas, estando comprometidas de forma irreversível com a formação dos espermatozoides.

As espermatogônias tronco (A_s) representam uma subpopulação do grupo de espermatogônias do tipo A, e são morfológicamente indistinguíveis das demais espermatogônias do tipo A quando analisadas por microscopia comum, mas podem ser identificadas por microscopia de alta resolução (CHIARINI-GARCIA; RUSSELL, 2001). Estas células dividem-se tanto para renovar a sua população (auto-renovação) quanto para dar origem às espermatogônias diferenciadas. Ao se dividirem dando origem às células filhas, a citocinese não se completa, de modo que as células filhas (A_{pr} e A_{al}) permanecem unidas por pontes intercelulares.

Esta capacidade de auto-renovação permite o repovoamento gradativo do túbulo seminífero em caso de perdas celulares por ação de agentes nocivos. As células germinativas diferenciadas são mais sensíveis à ação destes agentes que as espermatogônias não diferenciadas (DE ROOIJ; RUSSELL, 2000).

As células tipo A_2 se dividem não somente para dar origem às do tipo A_3 , mas também sofrem divisões específicas para substituir a população de espermatogônias tipo A_1 , participando deste processo de auto-renovação (AMANN; SCHANBACHER, 1983, WROBEL et al., 1995).

Estudos em ruminantes revelam ser possível descrever seis gerações de espermatogônias (tipo A_1 , tipo A_2 , tipo A_3 , intermediária [tipo ln], tipo B_1 e tipo B_2) antes da formação dos espermatócitos primários (BILASPURI; GURAYA, 1984, 1986; HOCHEREAU-DE REVIERS; MONET-KUNTZ; COUROT, 1987; RUSSELL et al., 1990; HESS; FRANÇA, 2008). No cão também são observadas seis gerações de espermatogônias (A_1 - A_4 , ln , B) (IBACH; WEISSBACH; HILSCHER, 1976), enquanto no equino (A_1 - A_3 , ln , B) (JOHNSON et al., 1994), suíno (A_1 - A_3 , ln , B) (FRANÇA, 1991) e coelho (A_1 - A_2 , ln_1 , ln_2 , B) (CASTRO, 1995), são observadas cinco gerações.

1.1.8 Espermatócitos

Com a última divisão mitótica das espermatogônias do tipo B são formados os espermatócitos primários (RUSSELL et al., 1990). Estes duplicam seu DNA e passam por progressivas modificações nucleares da prófase meiótica antes de entrarem em meiose, para formar os espermatócitos secundários. Sem nova síntese de DNA estes espermatócitos secundários dividem-se novamente, caracterizando a segunda divisão meiótica, para formar células haplóides, as espermatídes (CLERMONT, 1972).

Os espermatócitos primários em pré-leptóteno, formados pela última divisão espermatogonial, tem seu núcleo morfologicamente semelhante ao de sua célula progenitora, a espermatogônia B . Da mesma forma que há uma variação na configuração da cromatina da espermatogônia B , entre as espécies, também ocorre uma variação correspondente na morfologia nuclear dos espermatócitos pré-meióticos. Na fase de leptóteno, os grânulos da cromatina, que se encontravam distribuídos abaixo da membrana nuclear do espermatócito primário, tornam-se dispersos no núcleo e assumem uma forma filamentosa (HOCHEREAU-DE

REVIERS, 1976), esta alteração morfológica ocorre próximo ao final da intérfase. A partir desta fase, a morfologia do núcleo dos espermátócitos é muito semelhante entre mamíferos de espécies diferentes (CLERMONT, 1972).

Depois da fase de leptóteno os espermátócitos primários entram em zigóteno, período durante o qual há pareamento dos cromossomos homólogos. O pareamento dos cromossomos neste momento assume forma de longos laços, sendo esta forma chamada de “buquê”, o que segundo Clermont (1972), caracteriza esta fase. Então, o volume nuclear aumenta progressivamente e os cromossomos tornam-se mais compactos e entram na fase de paquíteno. Nesta fase a cromatina permanece nesta condição por longo período, possibilitando o aumento do volume nuclear. Isto é seguido por curta fase de diplóteno, durante a qual os cromossomos se separam parcialmente. Finalmente, o núcleo passa por metáfase, anáfase e telófase da primeira divisão para produzir os espermátócitos secundários. O núcleo em intérfase dos espermátócitos secundários é menor que do espermátócito primário em paquíteno. Estas células tem vida curta e, sem que haja duplicação do DNA, entram na segunda divisão meiótica (CLERMONT, 1972).

1.1.9 Espermátides

Depois da última divisão meiótica as espermátides arredondadas são formadas, e uma série de mudanças morfológicas, histoquímicas e bioquímicas vão ocorrer em seu núcleo e componentes do citoplasma (GURAYA, 1987). Esta fase de mudanças é chamada espermiogênese e vai culminar com a formação de células haplóides altamente diferenciadas e especializadas que são os espermatozóides.

No início da espermatogênese, as espermátides são caracterizadas por um núcleo pequeno e esférico, e citoplasma que apresenta organelas dispostas em zonas bem definidas (LEBLOND; CLERMONT, 1952; CLERMONT; LEBLOND, 1955).

A formação do acrossoma é semelhante entre os mamíferos, e ocorre durante a espermiogênese, durante sua formação apresenta fases distintas, sendo a primeira delas a fase de Golgi, e subsequentemente, as de capuchão, acrossômica e maturação (ORTAVANT; COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS, 1977).

Na fase de Golgi, o complexo de Golgi das espermátides recém formadas é composto de pequenos e numerosos vacúolos PAS-positivo que se encontram

rodeados por vesículas paralelas achatadas no limite da membrana. Dentro deste complexo dois ou três grânulos pró-acrossômicos PAS-positivo irão coalescer e formar um único grânulo acrossômico, este grânulo contido em uma vesícula move-se em direção à parte anterior do núcleo, e a membrana interna da vesícula adere na membrana nuclear (BURGOS; FAWCETT, 1955).

Na fase de capuchão, a vesícula acrossômica achata-se sobre o núcleo e o grânulo acrossômico aumenta e finalmente cobre quase dois terços do núcleo no carneiro e suíno, e um pouco menos no touro (ORTAVANT; COUROT; HOCHEREAU-DE REVIERS, 1977). Enquanto o capuz acrossômico se forma num pólo do núcleo, os centríolos migram para o pólo oposto junto à membrana nuclear onde se dará a formação do axonema e, em seguida, a formação da cauda (FAWCETT, 1970).

Na fase do acrossoma, o sistema acrossômico e o núcleo da espermátide rotacionam em direção à membrana do túbulo seminífero e ocorre o deslocamento do núcleo para a periferia do citoplasma. Em seguida, o núcleo torna-se mais alongado e achatado pelo processo de condensação da cromatina nuclear. O acrossoma intimamente aderido ao núcleo, também se condensa e alonga. Tais modificações são ligeiramente diferentes para cada espécie, de modo que resultam em espermátides alongadas de características específicas (FAWCETT, 1970). Junto com as modificações de morfologia nuclear, ocorre o deslocamento do citoplasma para o pólo oposto da célula, onde irá circundar a porção proximal da cauda em desenvolvimento (COSTA, 2001).

Na fase da maturação as diferenciações morfológicas para a formação dos espermatozóides se completam. Durante esta fase o núcleo completa sua condensação e assume sua forma definitiva. Uma bainha contendo nove fibras forma-se ao redor do axonema. As mitocôndrias, previamente concentradas ao redor do axonema, ordenam-se ao longo da peça intermediária formando a bainha mitocondrial. Grande parte do citoplasma, que era visto ao longo do flagelo, se desloca em direção ao núcleo e se destaca da célula, formando o corpo residual que é assimilado pela célula de Sertoli. Ocorre em seguida a espermição, que é a liberação dos espermatozóides para o lume tubular (LEBLOND; CLERMONT, 1952).

Apesar da liberação dos espermatozóides no lume dos túbulos seminíferos marcar o final da espermatogênese, tal célula ainda não está pronta para fecundar o ovócito, precisando sofrer modificações que vão desde aquelas que ocorrem durante

o trânsito epididimário (maturação espermática) até aquelas que ocorrerão no trato reprodutivo da fêmea (capacitação espermática) (COSTA; PAULA, 2003).

1.1.10 As células de Leydig

As células de Leydig são encontradas no espaço intertubular do parênquima testicular, juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras de tecido conjuntivo, macrófagos e mastócitos (RUSSELL et al., 1990; COSTA; PAULA, 2003).

Durante o desenvolvimento testicular de mamíferos são reconhecidas duas populações de células de Leydig, distintas morfológica e funcionalmente: as células de Leydig fetais e as adultas. As células de Leydig fetais desenvolvem-se durante a vida intrauterina e produzem testosterona e o fator do crescimento semelhante a insulina-3, atuando na diferenciação do sistema urogenital masculino e descida dos testículos até a bolsa escrotal (CHEN; GE; ZIRKIN, 2009). Estas células desaparecem com o desenvolvimento do indivíduo, embora algumas delas persistam após a maturidade sexual (LEJEUNE; HABERT; SAEZ, 1998).

As células de Leydig adultas emergem durante a puberdade através de um complexo processo de proliferação e diferenciação, no qual são identificados quatro tipos celulares, envolvidos na sequência de eventos, a partir de células precursoras (célula de Leydig tronco), que origina a célula de Leydig adulta madura: células progenitoras, adultas imaturas recém formadas, adultas imaturas e células de Leydig adultas maduras (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; CHEN; GE; ZIRKIN, 2009). Ambos os tipos celulares, células de Leydig adultas imaturas e maduras, possuem grande capacidade esteroidogênica, principalmente as células maduras, sendo assim, fundamentais para o início e manutenção da espermatogênese, competência reprodutiva e manutenção das características masculinas.

As células precursoras são fusiformes, não possuem receptores de LH nem atividade esteroidogênica. As células progenitoras são morfológicamente indistinguíveis das anteriores, porém, já estão definitivamente recrutadas em direção à linhagem de células de Leydig e expressam enzimas esteroidogênicas (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; HAIDER, 2004). A principal diferença morfológica entre as progenitoras e as células de Leydig adultas recém formadas é a mudança da forma fusiforme para poligonal. As células adultas recém formadas

correspondem à primeira fase de diferenciação a exibir as características típicas desta linhagem celular, com núcleo esférico ou discretamente ovalado e citoplasma bastante escasso e acidófilo, apresentando poucas ou nenhuma gotículas lipídicas. As células de Leydig adultas imaturas são maiores que as anteriores, possuem núcleo volumoso, cromatina descompactada, nucléolo evidente e citoplasma abundante, repleto de gotículas lipídicas. As células adultas maduras apresentam tamanho médio superior às anteriores, e não apresentam gotículas de gordura em seu citoplasma (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001).

A transição das células de Leydig imaturas para maduras é caracterizada pelo aumento significativo no tamanho médio das células e o desaparecimento das gotículas lipídicas do citoplasma, presentes nas células imaturas; aumento da quantidade de organelas necessárias para a produção de esteróides, principalmente Retículo endoplasmático liso, com aumento considerável da capacidade de secretar testosterona e diminuição da capacidade mitogênica (ZIRKIN; EWING, 1987; MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; HAIDER, 2004). Com isso, as células de Leydig maduras possuem maior produção de testosterona, menor metabolismo da testosterona e maior expressão de receptores para LH que as células imaturas (CHEN et al., 2010).

A proliferação e diferenciação das células de Leydig adultas sofrem efeito estimulatório, entre outros, pelo LH ou hCG e do IGF-I, e inibitório por estrógenos. O hormônio anti-mulleriano e o FSH exercem efeito inibitório apenas na proliferação destas células (WU; WAN; LEE, 2007). Apesar de estudos anteriores mostrarem que o LH é necessário para as atividades e proliferação das células de Leydig maduras, observou-se a diferenciação destas células em animais com insuficiência de LH (BAKER et al., 2003; WU; WAN; LEE, 2007).

Vários estudos citados por França e Russell (1998) e Silva Júnior e França (2001), indicam que dentre as organelas citoplasmáticas, o retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias ocupam de 40 a 80% e de 5 a 17% do volume celular, respectivamente, nos animais domésticos. O retículo endoplasmático liso possui vários sítios de ligação em sua superfície para uma grande quantidade de enzimas, que são necessárias para a conversão esteroidogênica realizada por esta célula (COSTA; PAULA, 2003). Ewing e Keeney (1993), relataram que as células de Leydig maduras possuem grande quantidade de retículo endoplasmático liso e poucas gotículas de éster de colesterol, o que evidencia sua alta capacidade de síntese de

esteróides em detrimento de sua baixa capacidade de armazenamento. Entretanto, Fawcett, Neaves e Flores (1973), afirmaram que a capacidade de síntese e de armazenamento que as células de Leydig possuem, é bastante variada entre os mamíferos.

Ewing et al. (1979), estudando a secreção de testosterona em cinco espécies de mamíferos (ratos, coelho, cobaia, cão e hamster), evidenciaram que as variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual das células de Leydig em secretar testosterona do que de diferenças do volume total ocupado pelas mesmas no testículo. Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente nesta célula (ZIRKIN et al., 1980). Outros fatores também podem influenciar na quantidade necessária de células de Leydig por animal, como por exemplo: a quantidade de LH disponível; o número de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo; a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, sanguíneos e fluido seminal; o volume sanguíneo do animal, e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSELL et al., 1994; RUSSELL, 1996).

Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular, a célula de Leydig é, geralmente, o tipo celular predominante neste compartimento (FAWCETT; NEAVES; FLORES, 1973; FRANÇA; RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999), porém, a percentagem das células de Leydig em relação ao volume testicular em alguns animais pode ser pequena, cerca de 1-5% em ratos, camundongos, chinchila e cobaia, e elevada em outros, entre 20-60% em suíno doméstico, zebra e toupeira (FAWCETT; NEAVES; FLORES, 1973). No touro, as células de Leydig correspondem de 3,9 (WROBEL, 1990) a 4,6% (LENNOX; LOGUE, 1979) do volume testicular.

1.2 Objetivos

Esta pesquisa foi conduzida com o objetivo geral de realizar um estudo comparativo da morfologia funcional da espermatogênese em cinco raças zebuínas criadas no Brasil. Os objetivos específicos foram: calcular o índice gonadossomático; determinar a população celular do epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero; calcular o rendimento intrínseco da espermatogênese e as perdas celulares nas diversas fases da espermatogênese; calcular as razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (índice de células de Sertoli); mensurar a altura do epitélio seminífero, o diâmetro e a área da secção transversal dos túbulos seminíferos; determinar a proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular; calcular o comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de parênquima testicular; e calcular a produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular nas cinco raças avaliadas.

Os resultados estão apresentados na forma de dois artigos, de acordo com normas do periódico *Animal Reproduction Science*, intitulados “Avaliação histomorfométrica do testículo de touros de raças zebuínas” e “Eficiência da espermatogênese de touros *Bos taurus indicus*”.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am. J. Anat.*, v.110, n.1, p.69-78, 1962.
- AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JONHSON, A. D., GOMES, W. R., VanDEMARK, N. L. (eds). *The testis*. v.1, New York: Academic Press, 1970. p.433-482.
- AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, v.2, p.37-58, 1981.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.*, v.57, p.380-403, 1983.
- APONTE, P. M.; DE ROOIJ, D. G.; BASTIDAS, P. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*, v.64, p.1440-1455, 2005.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Índex ASBIA – *Importação, exportação e comercialização de sêmen*, 21p. 2011. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2012.
- BAILEY, T. L.; MONKE, D.; HUDSON, R. S. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology*, v.46, p.881-887, 1996.
- BAKER, P. J. et al. Differentiation of adult-type Leydig cells occurs in gonadotrophin-deficient mice. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.1, n.4, 9p. 2003. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/1/1/4>>. Acesso em: 23 mar 2013.
- BANKS, W. J. *Histologia Veterinária Aplicada*, 2.ed., São Paulo: Manole, 1992. 629p.
- BERGMANN, J. A. G. Melhoramento genético da eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, X, 1993, Belo Horizonte, *suplemento*, Belo Horizonte: CBRA, 1993. p.70-86.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.*, v.44, n.5, p.818-883, 1977.
- BERNDTSON, W. E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am. J. Anat.*, v.140, p.167-180, 1974.
- BERNDTSON, W. E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B. W. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J. Anim. Sci.*, v.64, n.1, p.241-246, 1987.
- BERTSCHINGER, H. J. et al. Beef bull performance, scrotal circumference and semen quality. In: International congress on animal reproduction, 12, 1992, Hague. *Proceedings...*, v.3, p.1525-1527, 1992.
- BILASPURI, G. S.; GURAYA, S. S. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in goats (*Capra hircus*). *J. Agric. Sci.*, v.103, p.359-368, 1984.

- BILASPURI, G. S.; GURAYA, S. S. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in rams (*Ovis aries*). *Theriogenology*, v.25, n.4, p.485-505, 1986.
- BRITO, L. F. C. et al. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, v.62, p.1198-1217, 2004.
- BURGOS, M. H.; FAWCETT, D. W. Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.1, p.282-300, 1955.
- CARDOSO, F. M. *Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebus (Bos indicus) da raça nelore, do período fetal aos 36 meses de idade*. 1977. 140p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1977.
- CARDOSO, F. M. *Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebu (Bos indicus)*. 1981. 208p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1981.
- CASTRO, A. C. S. *A proposed acrossomal system identifying stages of the cycle of the seminiferous epithelium and a model for the kinetics of spermatogenesis in the rabbit*. 1995. 161p. Thesis (Ph D) –, University of New Hampshire, Durham, 1995.
- CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.1, p.25-34, 1997.
- CHEN, H.; GE, R-S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.306, p.9-16, 2009.
- CHEN, H. et al. Stem Leydig cells: From fetal to aged animals. *Birth Def. Res.*, v.90, p.272-283, 2010.
- CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L. D. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.* v.65, p.1170-1178, 2001.
- CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.*, v.112, p.35-51, 1963.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.*, v.52, n.1, p.198-236, 1972.
- CLERMONT, Y.; LEBLOND, C. P. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-schiff technique. *Am. J. Anat.*, v.96, n.2, p.229-253, 1955.
- COE, P. H.; GIBSON, P. B. Adjusted 200-day scrotal size as a predictor of 365-day scrotal circumference. *Theriogenology*, v.40, p.1065-1072, 1993.
- CORRÊA, A. B. et al. Características de sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.5, p.823-830, 2006.
- COSTA, D. S. *Análise morfofuncional da espermatogênese e características seminais de catetos (Tayassu tajacu)*. 2001. 61p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, 2001.

- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em mamíferos, *Scientia*, Vila Velha, v.4, n.1-2, p.53-72, 2003.
- COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. *Theriogenology*, v.11, n.4, p.297-311, 1979.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VanDEMARK, N. L. (eds). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, cap.6, p.339-432, 1970.
- DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Path.*, v.79, p.57-80, 1998.
- DE ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.*, v.21, p.776-798, 2000.
- DETIN, L. et al. Regulated expression and ultrastructural localization of Galectin-1, a proapoptotic β -Galactoside-Binding Lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol. Reprod.*, v.68, p.51-59, 2003.
- DRUMOND, A. L.; MEISTRICH, M. L.; CHIARINI-GARCIA, H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction*, v.142, p.145-155, 2011.
- DYM, M. The fine structure of the monkey (macaca) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat. Rec.*, v.175, p.639-656, 1973.
- EWING, L. L. et al. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, v.105, n.5, p.1135-1142, 1979.
- EWING, L. L.; KEENEY, D. S. Leydig cell: Structure and function. In: DESJARDINS, C.; EWING, L. L. (eds), *Cell and molecular biology of the testis*. New York: Oxford University. v.7, p.137-165, 1993.
- FAWCETT, D. W. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod.*, v.2, n.2, p.90-127, 1970.
- FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* v.9, p.500-532, 1973.
- FONSECA, V. O.; SANTOS, N. R.; MALINSKI, P. R. Classificação andrológica de touros zebu (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e morfologia do sêmen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.2, p.36-39, 1997.
- FRANÇA, L. R. *Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça piau*. 1991. 185p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, F. (eds). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219, 1998.

FRANÇA, L. R. et al. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* v.59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L. R.; BECKER-SILVA, S. C.; CHIARINI-GARCIA, H. Seminiferous epithelium cycle length in goats. *Tissue & Cell*, v.31, n.3, p.274-280, 1999.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63, p.300-318, 2005.

FREEMAN, D.A.; ROMMERTS, F. F. G. Regulation of Leydig cell cholesterol transport. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (eds) *The Leydig Cell.*, Vienna: Cache River, p.231-240, 1996.

GARCIA, O. S. *Características físicas e morfológicas do sêmen de touros normais de touros com distúrbios reprodutivos, de raças européias e indianas, criadas no estado de Minas Gerais.* 1971. 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1971.

GARCIA DERAGON, L. A.; LEDIC, I. L. Avaliação da circunferência escrotal em touros Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.14, n.4, p.227-233, 1990.

GEYMONAT, D. H.; MÉNDEZ, J. E. Circunferencia escrotal de toros y su relación con caracteres de producción y reproducción (Revisión de Literatura). In: OSTROWSKY, J. E. B. *Teriogenología IV.* Temas sobre fisiopatología de la reproducción de bovinos, ovinos e porcinos, 1.ed. Buenos Aires: Hemisferio Sur, p.46-66, 1987.

GIER, H. T.; MARION, G. B. Development of the mammalian testis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (EDS). *The testis I. Development, Anatomy, and Physiology.*, New York and London: Academic Press, p.2-45, 1970.

GODINHO, C. L. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros.* 1999. 80p. Dissertação (Mestrado em biologia celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.

GURAYA, S. S. *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 430p. 1987.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal.* 7.ed. Barueri: Manole, p.103, 2004.

HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.*, v.233, p.181-241, 2004.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Structure of the Sertoli Cell. In: SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. (eds). *Sertoli Cell Biology*, San Diego – California: Elsevier Academic Press. p.19-40, 2005.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Series: Adv. Exp. Med. Biol.*, v.636, p.1-15, 2008. Disponível em: <<http://www.landesbioscience.com/pdf/01ChengHess.pdf>>. Acesso em: 18/mar/2013.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T. Variation in the stock of testicular stem cells and in the yield of spermatogonial divisions in ram and bull testes. *Andrologia*, v.8, n.2, p.137-146, 1976.

- HOCHEREAU- DE REVIERS, M. T.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J. Reprod. Fertil.*, v.34, p.101-114, 1987.
- HOSKEN, R. F. Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. Athens – Georgia, v.13, n.13, 1997.
- IBACH, B.; WEISSBACH, L.; HILSCHER, B. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog. *Andrologia.*, v.8, n.4, p.297-307, 1976.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção pecuária municipal*, Rio de Janeiro, v.38, p.1-65, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2012.
- JACOMINI, J. O. et al. Morfogênese do testículo de embriões e fetos de vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.44, n.1, p.33-39, 2007.
- JOHNSON, L. Review article: spermatogenesis and aging in the human. *J. Androl.*, v.7, p.331-354, 1986a.
- JOHNSON, L. A new approach to quantification of Sertoli cells that avoids problems associated with the irregular nuclear surface. *Anat. Rec.*, v.214, n.3, p.231-237, 1986b.
- JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: *Reproduction in domestic animals*. 4.ed. CUPPS, P. T. (ed), New York: Academic Press, 456p, 1991.
- JOHNSON, L. et al. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *J. Reprod. Fertil.*, v.100, p.315-321, 1994.
- JOHNSON, L. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.471-480, 2000.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 9.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 429p.
- KUMI-DIAKA, J. et al. Quantitative estimation of spermatogenesis in bulls (*Bos indicus*) in a tropical environment of Nigeria. *Vet. Res. Commun.*, v.6, n.1, p.215-222, 1983.
- LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.55, n.4, p.548-573, 1952.
- LEJEUNE, H.; HABERT, R.; SAEZ, J. M. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J. Mol. Endocrinol.*, v.20, p.1-25, 1998.
- LENNOX, B.; LOGUE, D. N. Tubule length and Leydig cell volume in the normal bull testis. *Vet. Rec.*, v.104, p.431-433, 1979.
- LIN, M.; JONES, R. C. Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *J. Reprod. Fertil.*, v.90, p.361-367, 1990.

- MACIEL, A. S. et al. Contribuição dos testículos na produtividade do rebanho zebuíno. Biometria testicular. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 7, 1987, Belo Horizonte. *Anais...*, v.7, p.85, 1987.
- MACKAY, S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int. Rev. Cytol.*, v.200, p.47-99, 2000.
- MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R. B. Estimates of genetic correlations between sire scrotal circumference and offspring age at first calving in Nelore cattle. *Rev. Bras. Genet.*, v.14, n.1, p.209-212, 1991.
- MARTINS, J. A. M. *Desenvolvimento reprodutivo e análise das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina, em tourinhos Gir selecionados para a produção de leite*. 2010. 70p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.
- McGUINNESS, M. P.; ORTH, J. M. Reinitiation of gonocytes mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats *in vivo* and *in vitro*. *Anat. Rec.* v.233, p.527-537, 1992.
- MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; ARIYARATNE, H. B. S. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.*, v.65, p.660-671, 2001.
- MIRANDA, J. R. *Regulação da proliferação pós-natal das células de Sertoli em ratos*. 2006, 88p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.
- MOUSTAFA, L. A.; HAFEZ, E. S. E. Prenatal development of bovine reproductive system. *J. Reprod. Med.*, v.7, n.3, p.99-113, 1971.
- NEVES, A. L. A. *Biometria e morfologia testicular em bovinos da raça Nelore criados a pasto*. 2007, 47p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2007.
- OKWUN, O. E. et al. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *J. Reprod. Fertil.*, v.107, p.137-149, 1996.
- ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H. H.; CUPPS, P. T. (eds). *Reproduction in domestic animals*. 3.ed. New York: Academic Press. cap.8, p.203-227, 1977.
- ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, p.787-794, 1988.
- OSÓRIO, J. P. *Características reprodutivas dos seis aos 36 meses de idade de machos da raça Guzerá criados a pasto na região do cerrado mineiro*. 2010. 75p. Tese (Doutorado em Ciência animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.
- PACHECO, A. et al. Efeito da idade e de fazenda sobre as características seminais e perímetro escrotal em touros da raça Guzerá criados no norte e nordeste do Rio de Janeiro, Brasil. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. v.15, n.4, p.165-173, 2007.

- PAULA, T.A.R., FRANÇA, L.R., GARCIA, H.C. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue & Cell*. v.31, n.3, p.327-334, 1999.
- PEREY, B.; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C. P. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.*, v.108, p.47-77, 1961.
- ROCHA, E. P. et al. Biometria testicular em bovinos. III. Herdabilidade da circunferência escrotal. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 19. Piracicaba, 1982. *Anais...*, Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.238, 1982.
- ROOSEN-RUNGE, E. C.; GIESEL JUNIOR, L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.*, v.87, p.1-30, 1950.
- RUSSELL, L. D. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.*, v.148, p.313-328, 1977.
- RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (eds), *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, v.3, p.43-96, 1996.
- RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. *The Sertoli cell*. (ed). Clearwater, Florida: Cache River Press, p.1-37, 1993.
- RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. Determination of the elongate spermatid- Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.*, v.70, p.635-641, 1984.
- RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.*, v.94, p.177-211, 1985.
- RUSSELL, L. D. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater, Florida: Cache River Press, p.1-40, 1990.
- RUSSELL, L. D. et al. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int. J. Androl.*, v.17, n.2, p.93-106, 1994.
- SANTIAGO, A. A. *O Nelore*, São Paulo: Ed. dos Criadores, 1983. 583p.
- SANTOS, R. *O zebu – Edição comemorativa dos 60 anos do registro genealógico*, ABCZ – Associação Brasileira dos Criadores de Zebu, 1998. 856p.
- SETCHELL, B. P. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. In: CHENG, C. Y. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Series: Adv. Exp. Med. Biol.*, v.636, p.212-233, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-09597-4_12?LI=true#> Acesso em: 18/mar/2013.
- SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2.ed., N.Y.: Raven Press, p.1363-1434, 1994.
- SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, v.125, p.769-784, 2003.
- SILVA, A. E. F. A identificação da puberdade através do sêmen em gado Nelore. In: IV SIMPÓSIO: O Nelore do século XXI, 1997, Uberaba. *Anais...* Uberaba, MG, p.63-71, 1997.

- SILVA JÚNIOR, V. A.; FRANÇA, L. R. Células de Leydig e esteroidogênese em mamíferos. *Cad. Téc. Vet. Zootec.* v.35, p.15-29, 2001.
- SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymes. *Anat. Rec.*, v.161, p.171-186, 1968.
- SWIERSTRA, E. E.; GEBAUER, M. R.; PICKETT, B. W. Reproductive physiology of the stallion: I. Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fertil.*, v.40, p.113-123, 1974.
- TIMMONS, P. M.; RIGBY, P. W. J.; POIRIER, F. The murine seminiferous epithelial cycle is pré-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development*, v.129, p.635-647, 2002.
- UNANIAN, M. M. et al. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, n.1, p.136-144, 2000.
- VALE FILHO, V. R.; PINHEIRO, L. E. L.; BASRUR, P. K. Reproduction in zebu cattle. In: MORROW, D. A. *Current Therapy in Theriogenology 2*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p.437-442, 1986.
- VASCONCELOS, C. O. P. *Estádio de maturidade sexual em touros da raça Nelore dos 20 aos 22 meses de idade*. 2001. 69p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- VIU, M. A. O. et al. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. *Arch. Vet. Sci.*, v.11, n.3, p.53-57, 2006.
- WAITES, G. M.; GLADWELL, R. T. Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood-testis barrier. *Physiol. Rev.*, v.62, p.624-671, 1982.
- WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J. Anim. Sci.*, v.24, p.761-765, 1965.
- WONG, C-H. et al. Blood-testis barrier dynamics are regulated by α_2 -Macroglobulin via the c-Jun N-Terminal Protein Kinase pathway. *Endocrinology*, v.146, n.4, p.1893-1908, 2005.
- WROBEL, K-H. The postnatal development of the bovine Leydig cell population. *Reprod. Domest. Anim.*, v.25, n.2, p.51-60, 1990.
- WROBEL, K-H.; SÜB, F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. *Anat. Embryol.*, v.197, n.6, p.451-467, 1998.
- WROBEL, K-H. et al. Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell Tissue Res.*, v.279, p.277-289, 1995.
- WU, X.; WAN, S.; LEE, M. M. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J. Cell. Physiol.*, v.213, p.429-433, 2007.
- YAN, H. H. N.; CHENG, C. Y. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement / disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proceed. Nat. Acad. Sci. (PNAS)*. v.102, p.11722-11727, 2005.

ZIRKIN, B. R. et al. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, v.107, n.6, p.1867-1974, 1980.

ZIRKIN, B. R.; EWING, L. L. Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anat. Rec.*, v.219, p.157-163, 1987.

2 ARTIGO I: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO TESTÍCULO DE TOUROS DE RAÇAS ZEBUÍNAS

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar alguns parâmetros da histologia quantitativa e biometria testicular em touros de diferentes raças zebuínas. Utilizaram-se fragmentos testiculares de touros das raças Nelore (n=10), Nelore Mocho (n=6), Gir (n=5), Guzerá (n=5) e Tabapuã (n=5). Os fragmentos foram fixados por perfusão tecidual com solução de Karnovsky, incluídos em glicol metacrilato e corados com azul de toluidina – borato de sódio 1%. Animais da raça Nelore apresentaram maior proporção volumétrica tubular (85,2%) e maior altura do epitélio seminífero (73,2 μm) que aqueles das raças Gir, Guzerá e Tabapuã, e maior proporção volumétrica de células de Leydig (5,2%) que os animais das raças Guzerá e Tabapuã. Não houve diferença significativa em qualquer dos parâmetros avaliados entre as raças Nelore e Nelore Mocho. O índice gonadossomático, diâmetro do túbulo seminífero, área de secção transversal de túbulo seminífero e comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular não variaram entre as raças estudadas. Os parâmetros morfométricos avaliados sugerem que a seleção genética aplicada às raças Nelore e Nelore Mocho melhorou a eficiência do processo espermatogênico nesses reprodutores.

Palavras-chave: Bovino. Testículo. Zebu. Proporção volumétrica. Túbulo seminífero.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate some parameters of quantitative histology and testis biometry in bulls of different zebu breeds. We used testicular fragments from sexually mature Nelore (n=10), Polled Nelore (n=6), Gyr (n=5), Guzerat (n=5) and Tabapuã (n=5) bulls. The tissue was perfused with Karnovsky solution, included in glycol methacrylate and stained with toluidine blue – sodium borate 1%. Nelore bulls presented higher volumetric proportion tubular (85.2%), and height of seminiferous epithelium (73.2 μm) than Gyr, Guzerat and Tabapuã, and higher volumetric proportion of Leydig cells (5.2%) than Guzerat and Tabapuã bulls. There was no significant difference in any evaluated parameters between Nelore and Polled Nelore bulls. The gonadosomatic index, tubular diameter, cross-sectional area of seminiferous tubule and tubular length total and per gram of testicular parenchyma did not vary between the studied breeds. The morphometric parameters evaluated suggest that genetic selection applied to breeds Nelore and Polled Nelore improved the efficiency of spermatogenesis in these breeding.

Keywords: Spermatogenesis. Bovine. Testis. Zebu. Volumetric proportion. Seminiferous tubule.

2.1 INTRODUÇÃO

A maioria da população bovina mundial é mantida em regiões tropicais e subtropicais, com predominância de animais *Bos indicus* e mestiços *Bos indicus* x *Bos taurus*. Os animais zebuínos são melhor adaptados ao clima tropical, apresentando maior resistência ao estresse térmico e aos endo e ectoparasitos, assim como, são produtivos mesmo em dietas com forragens de baixa qualidade (Turner, 1980; Hansen, 2004).

Apesar da rusticidade e adaptabilidade dos touros zebuínos às condições brasileiras, inicialmente também se relatava seu desenvolvimento bem mais tardio em relação às raças europeias (Vale Filho et al., 1986). Atualmente tem-se percebido grande avanço no melhoramento genético dos animais zebuínos, o que tem encurtado a distância entre os índices produtivos destes em relação às raças europeias. Este efeito pode ser percebido na redução da idade à puberdade e maturidade sexual observada em rebanhos zebuínos, mesmo naqueles criados extensivamente (Vasconcelos et al., 2003; Brito et al., 2004; Martins et al., 2011), assim como no aumento do perímetro escrotal observado nos rebanhos selecionados (Vasconcelos et al., 2003; Corrêa et al., 2006; Viu et al., 2006; Martins et al., 2011; Neves et al., 2011).

O uso do perímetro escrotal como principal parâmetro para seleção de touros para reprodução, tem selecionado animais com maior produção espermática e maior volume testicular, o que implica diretamente em alterações na morfologia funcional deste órgão, justificando a necessidade de atualizações periódicas destas mensurações para se caracterizar a evolução dos índices morfométricos do parênquima testicular.

A proporção volumétrica das células de Leydig no tecido intertubular e os parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, tais como o diâmetro tubular, a espessura do epitélio seminífero e o comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular apresentam uma relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações para o estabelecimento da mesma em uma dada espécie e constituindo indicadores desta atividade em investigações envolvendo a função testicular (França e Russell, 1998; Paula et al., 1999).

Apesar da grande importância dos zebuínos em regiões de clima tropical, existem poucos estudos publicados relativos ao processo espermatogênico destes animais, destacando-se o trabalho de Cardoso (1981), que descreveu detalhadamente a cinética e quantificação da espermatogênese em touros Nelore.

Passados muitos anos de melhoramento genético aplicados à raça Nelore, é aceitável que alguns resultados obtidos por Cardoso (1981) já tenham sido superados. Por outro lado, são raras as publicações descrevendo o processo espermatogênico de touros de outras raças zebuínas, que apesar de ter menor contribuição no efetivo total de bovinos, no Brasil, são raças que participam efetivamente deste contexto, principalmente em cruzamentos com raças europeias.

Não foi encontrado qualquer artigo que tivesse realizado uma análise comparativa do processo espermatogênico de touros de diferentes raças zebuínas na literatura consultada, fato que motivou a realização deste estudo.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar alguns parâmetros da histologia quantitativa e biometria testicular, tais como: índice gonadossomático; proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular (túbulos seminíferos, tecido intertubular, estroma e células de Leydig); diâmetro e área de secção transversal tubular; altura do epitélio seminífero; e comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular, comparativamente entre bovinos de cinco raças zebuínas criadas no Brasil.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais, colheita dos testículos e aferição da biometria testicular

Foram colhidos testículos de 31 touros zebuínos, puros de origem (PO), das raças Nelore (n=10), Nelore Mocho (n=6), Gir (n=5), Guzera (n=5) e Tabapuã (n=5).

Todos os animais foram, inicialmente, submetidos a exame andrológico completo, certificando-se que não possuíam qualquer alteração detectada ao exame clínico dos órgãos genitais e avaliação do sêmen. Foram selecionados somente touros sexualmente maduros e que apresentaram ejaculado com, no mínimo, 50% de motilidade espermática progressiva e morfologia espermática com no máximo

10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos menores (Garcia et al., 1987).

Os animais selecionados foram orquiectomizados e todos os testículos foram colhidos, separados dos respectivos epidídimos, pesados em balança de precisão. Um testículo de cada animal foi congelado e, posteriormente, dissecado para determinação do percentual ocupado pela túnica albugínea e mediastino.

2.2.2 Processamento histológico

Imediatamente após a dissecação do epidídimo e pesagem, um dos testículos de cada animal foi perfundido, para fixação, com solução de Karnovsky. Fragmentos testiculares de 2,0 x 5,0 x 5,0 mm foram coletados e incluídos em glicol metacrilato segundo Costa et al. (2004). Foram realizados cortes histológicos de quatro micrômetros (4 μm) de espessura utilizando-se navalha de vidro em micrótomo rotativo. Os cortes histológicos foram corados com solução de azul de toluidina – borato de sódio a 1%, e as lâminas montadas com Entellan[®] (Merck).

2.2.3 Peso do parênquima testicular e índice gonadossomático

Após a retirada do epidídimo e dissecação de um testículo de cada animal, o peso do parênquima testicular foi calculado subtraindo-se do peso testicular o peso da túnica albugínea e mediastino. Uma vez que a densidade testicular é muito próxima de 1 (Johnson et al., 1981), o volume testicular foi considerado igual ao peso. O índice gonadossomático representa o percentual de massa corpórea que é alocada nos testículos.

2.2.4 Proporção volumétrica dos constituintes do parênquima testicular

A proporção volumétrica de túbulo seminífero, células de Leydig, estroma e tecido intertubular foram obtidas com auxílio do *software* “ImageJ 1.34s” (Rasband, 2005), utilizando-se uma grátula com 420 intercessões consideradas como pontos. Foram computados os pontos coincidentes com células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, lume de vaso sanguíneo, parede de vaso sanguíneo, espaço linfático, túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular, examinados em 20

campos escolhidos ao acaso por meio de varredura horizontal dos cortes histológicos. Assim, as proporções volumétricas, expressas em percentagem, foram calculadas sobre um total de 8400 pontos por testículo. O aumento utilizado para esta análise foi de 400x.

2.2.5 Diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e área da secção transversal

A aferição do diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtida a partir da medida do diâmetro de 20 secções transversais de túbulos em cada animal. As secções escolhidas foram as que se apresentaram mais circulares, independentemente do estágio do CES em que se encontravam. As mensurações foram feitas com auxílio do *software* de morfometria “ImageJ 1.34s” (Rasband, 2005). A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Foi considerada a distância desde a membrana basal até a borda luminal, e realizadas duas medições em cada secção transversal, sendo anotado como resultado a média das mesmas. A área de secção transversal de túbulo seminífero foi calculada utilizando o dispositivo “*area calculator*” do *software* “ImageJ 1.34s” (Rasband, 2005), foram avaliadas 20 secções transversais de túbulos em cada animal.

2.2.6 Comprimento total dos túbulos seminíferos e por grama de parênquima testicular

O comprimento total dos túbulos seminíferos foi calculado segundo Attal e Courot (1963).

A área da secção transversal foi aferida com auxílio do *software* “ImageJ 1.34s” (Rasband, 2005). Foram medidas 20 secções transversais de túbulo seminífero, independentemente do estágio em que se encontravam.

Os valores da área da secção transversal e do volume total corrigido dos túbulos seminíferos foram estimados considerando-se um fator de retração linear dos tecidos de 5% (Amann, 1981). O resultado do comprimento total dos túbulos foi expresso em metros.

O comprimento tubular por grama de parênquima testicular foi obtido dividindo-se o comprimento total pelo peso do parênquima testicular.

2.2.7 Análise estatística

Os cálculos das médias e desvios padrão foram realizados com auxílio da função estatística do programa *Microsoft Office Excel*. As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey através do programa estatístico *BioEstat 3.0* (Ayres et al., 2003). O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

2.3 RESULTADOS

A idade dos animais utilizados variou de 4 a 10 anos, com média de 7,2 anos, e não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre as raças. As raças Nelore e Nelore Mocho foram as que apresentaram maior peso corporal médio, não diferindo significativamente entre si, porém, houve diferença entre estas e as demais raças estudadas. O peso corporal médio não variou significativamente entre as raças Gir, Guzerá e Tabapuã (Tabela 1).

Tabela 1. Idade, peso corporal, peso testicular e do parênquima testicular, e índice gonadossomático (IGS) de touros de diferentes raças zebuínas*.

Raça	Idade (anos)	Peso Corporal (kg)	Peso Testicular Total (g)**	Peso Parênquima Testicular (g)***	IGS (%)
Nelore	6,3 ± 1,49 ^a	575,6 ± 28,48 ^a	372,8 ± 52,92 ^a	342,2 ± 48,57 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
Nelore Mocho	7,4 ± 1,11 ^a	540,7 ± 45,64 ^a	332,8 ± 24,73 ^{ab}	305,3 ± 22,69 ^{ab}	0,12 ± 0,00 ^a
Gir	8,4 ± 1,14 ^a	483,4 ± 11,17 ^b	291,2 ± 35,51 ^b	267,2 ± 32,58 ^b	0,12 ± 0,01 ^a
Guzerá	7,0 ± 2,00 ^a	466,2 ± 14,61 ^b	302,4 ± 25,50 ^b	277,2 ± 23,38 ^b	0,13 ± 0,01 ^a
Tabapuã	7,6 ± 1,14 ^a	466,0 ± 14,73 ^b	298,0 ± 22,23 ^b	273,6 ± 20,41 ^b	0,13 ± 0,01 ^a

*Média ± DP **Peso de apenas um testículo *** Peso testicular total – peso albugínea e mediastino. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os pesos médios de testículo e de parênquima testicular verificados foram maiores ($p < 0,05$) nos animais da raça Nelore (372,8g e 342,2g, respectivamente), não diferindo apenas da raça Nelore Mocho (332,8g e 305,3g, respectivamente). Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as raças Nelore Mocho, Gir,

Guzerá e Tabapuã (Tabela 1). A túnica albugínea e o mediastino, somados, ocuparam aproximadamente 8,2% do volume testicular em todas as raças. O índice gonadossomático médio entre as raças foi $0,13 \pm 0,01$; não havendo diferença significativa entre as mesmas (Tabela 1).

Nota-se que a proporção volumétrica entre os constituintes do parênquima testicular não foi uniforme entre as raças avaliadas. A proporção volumétrica tubular não variou entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã, mas foi maior ($p < 0,05$) nos animais da raça Nelore quando comparados às demais raças, exceto à Nelore Mocho. Conseqüentemente, a proporção volumétrica do tecido intertubular foi menor ($p < 0,05$) nos animais da raça Nelore, exceto em comparação com a raça Nelore Mocho (Tabela 2).

Tabela 2. Proporção volumétrica (%) dos constituintes do parênquima testicular de touros de diferentes raças zebuínas*.

Raça	Túbulo Seminífero	Células de Leydig	Estroma**	Compartimento Intertubular
Nelore	$85,2 \pm 1,80^a$	$5,2 \pm 0,35^a$	$9,6 \pm 1,76^a$	$14,8 \pm 1,81^a$
Nelore Mocho	$84,0 \pm 1,91^{ab}$	$4,8 \pm 0,59^{ab}$	$11,2 \pm 1,77^{ab}$	$16,0 \pm 1,92^{ab}$
Gir	$81,8 \pm 1,19^b$	$4,7 \pm 0,44^{ab}$	$13,5 \pm 1,35^b$	$18,2 \pm 1,19^b$
Guzerá	$82,5 \pm 1,07^b$	$4,3 \pm 0,18^b$	$13,2 \pm 1,06^b$	$17,5 \pm 1,07^b$
Tabapuã	$82,3 \pm 0,48^b$	$4,4 \pm 0,43^b$	$13,3 \pm 0,58^b$	$17,7 \pm 0,48^b$

*Média \pm DP **Estroma compreende: células e fibras de tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

As células de Leydig ocuparam, em média, $4,7 \pm 0,5\%$ do tecido intertubular, não diferindo ($p > 0,05$) entre as raças Nelore, Nelore Mocho e Gir, e nem entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã. A raça Nelore apresentou a proporção volumétrica ocupada pelas células de Leydig (5,2%) no tecido intertubular maior ($p < 0,05$) que nas raças Guzerá (4,3%) e Tabapuã (4,4%) (Tabela 2). A proporção volumétrica do estroma testicular, que compreende células e fibras de tecido conjuntivo, nervos e vasos sanguíneos e linfáticos, foi em média $11,7 \pm 2,2\%$. Não ocorreu diferença significativa entre as raças Nelore e Nelore Mocho, e nem entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã (Tabela 2).

O diâmetro médio do túbulo seminífero variou discretamente nas raças estudadas, de 246,6 a 257,9 μm , não apresentando diferença significativa entre as mesmas (Tabela 3).

O epitélio seminífero apresentou altura média, entre as raças, de $70,9 \pm 2,2$ μm (média \pm desvio padrão). Pouca diferença foi constatada entre as raças, porém, a raça Nelore apresentou a altura do epitélio seminífero significativamente maior que nas raças Gir, Guzerá e Tabapuã, mas não com relação à raça Nelore Mocho. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã (Tabela 3).

Tabela 3. Diâmetro tubular (μm), altura do epitélio seminífero (μm), área da secção transversal de epitélio seminífero (μm^2), comprimento tubular por testículo (m) e comprimento tubular por grama de parênquima testicular (m) de touros de diferentes raças zebuínas*.

Raça	Diâmetro do túbulo seminífero**	Altura do epitélio seminífero	Área da secção transversal de túbulo seminífero**	Comprimento tubular por testículo	Comprimento tubular/g de parênquima testicular
Nelore	$257,0 \pm 7,21^a$	$73,2 \pm 1,40^a$	$51914,1 \pm 2914,1^a$	$5639,6 \pm 891,66^a$	$16,5 \pm 0,67^a$
Nelore Mocho	$251,5 \pm 6,19^a$	$71,0 \pm 1,80^{ab}$	$49688,6 \pm 2443,1^a$	$5182,0 \pm 509,78^a$	$16,9 \pm 0,58^a$
Gir	$246,6 \pm 7,23^a$	$69,5 \pm 1,63^b$	$47785,0 \pm 2796,2^a$	$4564,8 \pm 325,20^a$	$17,2 \pm 0,99^a$
Guzerá	$247,9 \pm 8,32^a$	$69,3 \pm 1,60^b$	$48300,5 \pm 3225,8^a$	$4782,8 \pm 705,38^a$	$17,2 \pm 1,22^a$
Tabapuã	$248,6 \pm 4,71^a$	$69,0 \pm 0,84^b$	$48536,0 \pm 1831,0^a$	$4656,0 \pm 466,36^a$	$17,0 \pm 0,73^a$

*Média \pm DP **Adotado um coeficiente de retração linear de 5%, conforme Amann (1981). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

A área de secção transversal dos túbulos seminíferos nas raças estudadas foi em média $49.689,7 \pm 3035,9$ μm^2 (média \pm desvio padrão), com variação de $51.914,1$; na raça Nelore, até $47.785,0$ na raça Gir, não havendo diferença significativa entre todas as raças avaliadas (Tabela 3).

Considerando que a raça Nelore foi a que apresentou maior peso testicular, o comprimento tubular por testículo também foi maior nesta raça ($5.639,6$ metros), no entanto, não diferiu ($p > 0,05$) das demais raças. O comprimento tubular por grama de parênquima testicular variou de $16,5$ a $17,2$ metros, não havendo diferença significativa entre as raças avaliadas (Tabela 3).

2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados animais puros de origem (PO), sexualmente maduros, sem diferença significativa na faixa etária entre as raças (Tabela 1), evitando-se efeitos da imaturidade sexual nos resultados.

Na maioria das espécies domésticas a proporção volumétrica da túnica albugínea e mediastino testicular, correspondem a cerca de 10% e 0,5-1,0%, respectivamente, do peso testicular (França e Russell, 1998), exceto em carnívoros, nos quais se observa aproximadamente 18% no gato doméstico (França e Godinho, 2003) e em cães (Mascarenhas et al., 2006). No presente estudo, os animais da raça Nelore possuíram o maior peso testicular médio, assim como do parênquima testicular. Somados, a túnica albugínea e o mediastino testicular ocuparam aproximadamente 8,2% do volume testicular em todas as raças avaliadas, percentual aproximado (8,7% para túnica albugínea e cerca de 1% para o mediastino) ao citado por Amann (1961, 1962). Durante a dissecação do testículo ocorre grande dificuldade de isolamento e remoção por completo do mediastino testicular, ocasionando subestimações de valores (Castro et al., 1997).

O peso corporal alocado em testículos não diferiu significativamente entre as raças zebuínas estudadas, com média de 0,13%, índice superior ao observado por Cardoso (1981) em animais da raça Nelore (0,08%), e também em animais jovens (17-18 meses) da raça Shorthorn (0,08%, Swierstra, 1966).

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular varia consideravelmente entre as espécies, refletindo diretamente na eficiência da produção espermática de cada uma (França e Russell, 1998). Na maioria das espécies de mamíferos os túbulos seminíferos ocupam entre 60 e 90% do volume testicular (Setchell, 1982), e os restantes 10 a 40% corresponde ao tecido intertubular, constituído de células de Leydig e estroma (células e fibras de tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos) (França e Russell, 1998).

No presente estudo observou-se proporção volumétrica tubular maior ($p < 0,05$) na raça Nelore em comparação às raças Gir, Guzerá e Tabapuã. Os valores observados nas raças Nelore (85,2%) e Nelore mocho (84,0%) foram superiores aos observados em touros Nelore (81,4%) por Cardoso (1981), podendo sugerir que a

seleção genética aplicada a estas raças possam ter influenciado um aumento na proporção volumétrica dos túbulos seminíferos nos testículos.

Valores muito inferiores foram observados por Goiozo (2008) (76,4%), em animais da raça Nelore puros de origem, e por Santos et al. (1999) (72,0%), em animais zebuínos sem informações raciais. Porém, nestes estudos, considerou-se o peso testicular bruto, sem desconto do peso da túnica albugínea e mediastino testicular, o que pode ter proporcionado uma subestimação dos valores. Além disso, os animais utilizados por Santos et al. (1999), aparentemente foram animais comuns, de baixo mérito genético. Valores inferiores também foram observados em touros da raça Holandesa, notando-se maior proporção volumétrica tubular nos animais mais jovens (77,1 – 76,5%; 29 meses – 3 anos de idade) em comparação aos mais velhos (73,0%; 5,4 a 8,6 anos) (Amann, 1962; Amann e Almquist, 1962).

A percentagem das células de Leydig em relação ao volume testicular é bastante variável entre os animais, podendo ser de cerca de 1-5% em ratos, camundongos, chinchilas e cobaias, até entre 20 e 60% no suíno doméstico, zebra e toupeira (Fawcett et al., 1973). Apesar dos animais da raça Nelore apresentarem volume de tecido intersticial menor ($p < 0,05$) que as raças Gir, Guzerá e Tabapuã, a proporção volumétrica das células de Leydig foi significativamente maior na raça Nelore em comparação com as raças Guzerá e Tabapuã. Porém, os valores observados foram próximos aos encontrados em animais da raça Nelore (4,8%; Cardoso, 1981), em várias raças (4,6%; Lennox e Logue, 1979), em animais jovens (29 meses) da raça Holandesa (5,0%; Amann, 1962), superiores aos animais da raça Nelore (3,7%; Goiozo, 2008), e inferiores ao observado em animais da raça Holandesa (7,0%, Amann, 1962).

Os animais das raças zebuínas avaliadas no presente estudo apresentaram diâmetro médio do túbulo seminífero (251,4 μm) semelhante ao observado em touros Holandeses (254,0 μm) de 29 meses de idade (Amann, 1962), e superior ao observado em animais da raça Nelore de 4,9 anos de idade (232,7 μm ; Cardoso, 1981), Shorthorn de 17-18 meses de idade (210,4 μm ; Swierstra, 1966), e animais zebuínos sem caracterização racial (197,6 μm ; Santos et al., 1999). Maior diâmetro tubular foi observado por Amann (1962) em touros maduros da raça Holandesa (269,0 μm), porém, apenas dois animais foram avaliados.

Os valores diferentes observados entre os estudos podem estar relacionados ao melhoramento genético aplicado às raças, selecionando-se animais com maior produção espermática, mas também deve-se considerar as diferenças na metodologia aplicada, principalmente no que se refere à amostragem utilizada e à correção dos cálculos em virtude da retração tecidual linear que ocorre durante o processamento do material. Por exemplo, quando se trabalha com inclusões em parafina, que segundo Amann (1981) podem chegar a 15% de retração. Além disso, o uso de animais sexualmente imaturos pode interferir nestas aferições (Paula et al., 1999).

Em condições normais, o diâmetro tubular médio não sofre alterações significativas em animais sexualmente maduros que não possuem sazonalidade reprodutiva (França e Russell, 1998). O diâmetro tubular varia de 180 a 300 μm para a maioria dos amniotas (Roosen-Runge, 1977).

São raras as informações referentes à altura do epitélio seminífero em bovinos. No presente estudo, os animais da raça Nelore apresentaram altura do epitélio seminífero significativamente maior que as raças Gir, Guzará e Tabapuã, porém, todas as raças apresentaram valores próximos à pequena variação observada entre os diversos estádios do ciclo do epitélio seminífero em bovinos (72,0 a 79,0 μm ; Wrobel e Schimmel, 1989). Valores inferiores (53,4 μm) foram observados por Santos et al. (1999) em animais zebuínos sem caracterização racial.

A aferição da área de secção transversal de túbulo seminífero foi facilitada a partir da disponibilização de programas de morfometria, tornando um parâmetro geralmente avaliado em estudos da histomorfometria testicular. Apesar disso, na literatura consultada não foi encontrada qualquer citação deste parâmetro em bovinos. A área de secção transversal de túbulo seminífero não diferiu ($p > 0,05$) entre as raças avaliadas no presente estudo.

O comprimento total dos túbulos seminíferos corresponde ao volume total de túbulos dividido pela área de secção transversal do túbulo, assim, está relacionado diretamente ao tamanho do testículo e, portanto, neste contexto, o comprimento tubular por grama de parênquima testicular é um parâmetro mais acurado para a comparação da capacidade espermatogênica. Nos animais avaliados no presente estudo não ocorreu diferença estatística no comprimento tubular total ou por grama de parênquima testicular, e os valores encontrados foram próximos àqueles observados em touros Nelore (13,9 metros; Cardoso, 1981) e superiores aos

animais jovens da raça Shorthorn (10,4 metros; Swierstra, 1966). Resultados obtidos em vários estudos demonstram uma variação de 10 a 15 metros em mamíferos domésticos (França e Russell, 1998).

Comparando os resultados, nota-se algum avanço em vários parâmetros obtidos nos animais da raça Nelore do presente estudo em relação àqueles de Cardoso (1981), tais como, o índice gonadossomático, a proporção volumétrica e diâmetro de túbulos seminíferos, e o comprimento tubular por grama de parênquima testicular. Além das diferenças na metodologia utilizada entre os estudos, a origem dos animais utilizados por Cardoso (1981), Nelores comuns, pode ter influenciado negativamente os resultados, em comparação aos animais puros de origem do presente estudo. Além disso, decorridas três décadas, o melhoramento genético aplicado às raças zebuínas no Brasil pode ter contribuído com o aumento de parâmetros relacionados à capacidade espermatogênica, principalmente na raça Nelore.

Em todas as comparações, os animais avaliados por Santos et al. (1999) apresentaram números inferiores, aparentemente trataram-se de animais comuns, não submetidos a processo de seleção para melhoramento de características reprodutivas, o que pode sugerir que os valores inferiores estão relacionados ao grau de melhoramento genético dos animais relacionados.

Analisando os resultados obtidos no presente estudo, nota-se que, apesar de numericamente superiores na raça Nelore, não houve diferença significativa em qualquer dos itens avaliados entre esta e a raça Nelore Mocho. O fato da raça Nelore Mocho ter surgido como uma variedade da raça Nelore padrão, em época não tão remota, com o início dos registros genealógicos no ano de 1969 (Santos, 1998), além da distância genética entre estas duas raças ser de baixa magnitude (Vozzi et al., 2006), talvez possa justificar tal semelhança. Além disso, atualmente a raça Nelore Mocho é a segunda em comercialização de sêmen no Brasil entre as raças zebuínas (ASBIA, 2011).

Através do conteúdo dos sumários de touros publicados no Brasil, pode-se concluir que a raça Nelore, entre os outros zebuínos, é a que recebe maior seleção genética neste País. Segundo estes sumários, no ano de 1984 apenas 395 touros Nelore, e nenhum das raças Gir, Guzerá e Tabapuã foram avaliados. No ano de 2006, foram avaliados 30.820 touros da raça Nelore, e apenas 3.067 Gir, 3.267 Guzerá e 2.025 da raça Tabapuã (Rosa et al., 2009). Já em 2012, foram avaliados

41.912 touros da raça Nelore, contra apenas 3.557 touros da raça Gir, 4.314 da raça Guzerá e 2.795 touros da raça Tabapuã (ABCZ, 2013).

Além disso, no ano de 2011 foram comercializadas, no Brasil, 3.017.815 doses de sêmen da raça Nelore, contra 258.868 do Nelore Mocho, 13.041 do Gir, 169.335 do Guzerá e 84.061 do Tabapuã (ASBIA, 2011).

Nota-se valores significativamente maiores em grande parte dos parâmetros na raça Nelore em comparação com as raças Gir, Guzerá e Tabapuã, coincidentemente, estas são as raças com menor comercialização de sêmen no Brasil (ASBIA, 2011). Aparentemente, o processo seletivo aplicado a cada raça avaliada poderia ter alguma relação com estes resultados.

2.5 CONCLUSÕES

Os parâmetros da histologia quantitativa e biometria testicular da raça Nelore foram semelhantes aos da raça Nelore Mocho e superiores aos das raças Gir, Guzerá e Tabapuã.

REFERÊNCIAS

ABCZ, 2013. Sumário Nacional de Avaliação Genética – 2012 / 2013. Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos (PMGZ). Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ). Disponível em: <<https://www.abczstat.com.br/comunicacoes/sumario/apresentacao/default.aspx>> Acesso em 30/04/2013.

Amann, R.P., 1961. Reproductive physiology of the male bovine. Thesis (Ph.D), The Penn. State Univ., University Park.

Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. Am. J. Anat. 110, 49-67.

Amann, R.P., 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. J. Androl. 2, 37-58.

Amann, R.P., Almquist, J.O., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. J. Dairy Sci. 45, 774-781.

- ASBIA, 2011. Índex ASBIA – Importação, exportação e comercialização de sêmen. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. p.21. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf>> Acesso em 13/03/2012.
- Attal, J., Courot, M., 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 3, 219-241.
- Ayres, M., Ayres Jr. M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. Bio Estat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém, Sociedade Civil Maniraua, Brasília CNPq.
- Brito, L.F.C, Silva, A.E.D.F., Unanian, M.M., Dode, M.A.N., Barbosa, R.T., Kastelic, J.P., 2004. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. Theriogenology. 62, 1198-1217.
- Cardoso, F.M., 1981. Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebu (*Bos indicus*). Belo Horizonte: UFMG. 208p. Tese (Doutorado em Morfologia) Universidade Federal de Minas Gerais.
- Castro, A.C.S., Berndtson, W.E., Cardoso, F.M., 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e sua aplicação em estudos da reprodução de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim. 21(1), 25-34.
- Corrêa, A.B., Vale Filho, V.R., Corrêa, G.S.S., Andrade, V.J., Silva, M.A., Dias, J.C., 2006. Características de sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58 (5), 823-830.
- Costa, D.S., Henry, M., Paula, T.A.R., 2004. Espermatogênese de Catetos (*Tayassu tajacu*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56, 46-51.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol. Reprod. 9, 500-532.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid. pp.197-219.
- França, L.R., Godinho, C.L., 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol. Reprod. 68, 1554-1561.

- Garcia, J.M., Pinheiro, L.E.L., Okuda, H.T., 1987. Body development and semen physical characteristics of Young Guzera bulls. *Ars. Vet.* 3 (1), 47-53.
- Goiozo, P.F.I., 2008. Influência das alterações testiculares diagnosticadas pela histopatologia sobre as características biométricas, morfológicas e seminais em touros da raça Nelore. Botucatu: UNESP. 76p. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) Universidade Estadual Paulista.
- Hansen, P.J., 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *An. Reprod. Sci.* 80-83, 349-360.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B., 1981. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 25, 217-226.
- Lennox, B., Logue, D.N., 1979. Tubule length and Leydig cell volume in the normal bull testis. *Vet. Rec.* 104, 431-433.
- Martins, J.A.M., Souza, F.A., Ferreira, M.B.D., Gonçalves, P.E.M., Emerick, L.L., Dias, J.C., Leite, T.G., Graça, D.S., Andrade, V.J., Vale Filho, V.R., 2011. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Gir selecionados para produção de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63 (6), 1277-1286.
- Mascarenhas, R.M., Paula, T.A.R., Carretta Jr, M., Ribeiro, E.C.S., Borboleta, L.R., Matta, S.L.P., 2006. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em cães. *Revista CERES.* 53 (305), 100-105.
- Neves, A.L.A., Del Rei, A.J., Santos, M.P., 2011. Crescimento testicular de touros da raça Nelore. *Livestock Research for Rural Development*, 23 (4), 93-100.
- Paula, T.A.R., França, L.R., Garcia, H.C., 1999. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue & Cell.* 31 (3), 327-334.
- Rasband, W., National Institute of Health, USA. Software disponível em <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> Acessado em 20/03/2005.
- Roosen-Runge, E.C., 1977. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: University Press, pp.32-78
- Rosa, A.N., da Silva, L.O.C., Nobre, P.R.C., Torres Júnior, R.A.A., Amaral, T.B., 2009. Avaliação genética, zootécnica e funcional de touros. In: Amaral, T.B., Sereno, J.R.B., Pellegrin, A.O. Fertilidade, Funcionalidade e Genética de Touros Zebuínos. Corumbá: Embrapa Pantanal; Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Planaltina: Embrapa

Cerrados, 216p. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=Livro35> Acessado em 15/05/2011.

Santos, R., 1998. Edição comemorativa dos 60 anos do registro genealógico. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu – ABCZ. pp.856.

Santos, R.L., Silva, C.M., Ribeiro, A.F.C., Vasconcelos, A.C., Pesquero, J.L., Coelho, S.G., Serakides, R., Reis, S.R., 1999. Effect of growth hormone and induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology*. 51, 957-984.

Setchell, B.P., 1982. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin, C.R., Short, R.V. (eds). *Reproduction in mammaliam*. London: Elek. 1(4), 63-101.

Swierstra, E.E., 1966. Structural composition of Shorthorn bull testes and daily spermatozoa production as determined by quantitative testicular histology. *Can. J. Anim. Sci.* 46, 107-119.

Turner, J., 1980. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. *J. Anim. Sci.* 50, 1201-1205.

Vale Filho, V.R., Pinheiro, L.E.L., Basrur, P.K., 1986. Reproduction in zebu cattle. In: Morrow, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*. 2. W.B. Saunders Company, Philadelphia pp.437-442.

Vasconcelos, C.O.P., Guimarães, J.D., Guimarães, S.E.F., Costa, E.P., Miranda Neto, T., Dias, F., 2003. Estádio de maturidade sexual em touros da raça Nelore, dos 20 aos 22 meses de idade. *Rev. Bras. Reprod. An.* 27 (2), 174-175.

Viu, M.A.O., Magnabosco, C.U., Ferraz, H.T., Gambarini, M.L., Oliveira Filho, B.D., Lopes, D.T., Viu, A.M.F., 2006. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. *Arch. Vet. Sci.* 11 (3), 53-57.

Vozzi, P.A., Marcondes, C.R., Magnabosco, C.U., Bezerra, L.A.F., Lôbo, R.B., 2006. Structure and genetic variability in Nelore (*Bos indicus*) cattle by pedigree analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (3), 482-485.

Wrobel, K-H., Schimmel, M., 1989. Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenic cycle. *Cell Tissue Res.* 257, 93-103.

3 ARTIGO II: EFICIÊNCIA DA ESPERMATOGÊNESE DE TOUROS *Bos taurus indicus*

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a eficiência da espermatogênese através da morfometria do parênquima testicular de touros de diferentes raças zebuínas. Utilizaram-se fragmentos testiculares de touros das raças Nelore (n=10), Nelore Mocho (n=6), Gir (n=5), Guzerá (n=5) e Tabapuã (n=5). Os fragmentos foram fixados por perfusão tecidual com solução de Karnovsky, incluídos em glicol metacrilato e corados com azul de toluidina – borato de sódio 1%. Animais da raça Nelore apresentaram maior população de espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (38,30) e em paquíteno (38,14) e espermátides arredondadas (113,30), maior rendimento das mitoses espermatogoniais (21,2) e maior produção espermática diária por grama de parênquima testicular ($32,8 \times 10^6$) que aqueles das raças Gir, Guzerá e Tabapuã, e maior rendimento geral da espermatogênese (62,4) que os das raças Gir e Tabapuã. Não houve diferença ($p > 0,05$) em qualquer dos parâmetros avaliados entre as raças Nelore e Nelore Mocho. O índice de células de Sertoli não variou entre as raças estudadas. Aparentemente a seleção genética aplicada às raças tem melhorado o rendimento do processo espermatogênico pela diminuição das perdas celulares, porém, não aumentou a capacidade de suporte das células de Sertoli.

Palavras-chave: Espermatogênese. Bovino. Zebu. Testículo. Produção espermática diária.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the efficiency of the spermatogenesis through the morphology of the testicular parenchyma in bulls of different zebu breeds. We used testicular fragments from bull of the breeds Nelore (n=10), Polled Nelore (n=6), Gyr (n=5), Guzerat (n=5) and Tabapuã (n=5). The tissue was perfused with Karnovsky solution, included in glycol methacrylate and stained with toluidine blue – sodium borate 1%. Animals of the Nelore breed presented higher population of primary spermatocyte in preleptotene/leptotene (38.30) and in pachytene (38.14) and round spermatids (113.30), higher yield of spermatogonia mitosis (21.2) and higher daily spermatid production per gram of testicular parenchyma (32.8×10^6) than those from breeds Gyr, Guzerat and Tabapuã. There was no significant difference in any of the evaluated parameters between breeds Nelore and Polled Nelore. The rate of Sertoli cells did not vary between the studied breeds. Apparently the genetic selection applied to the breeds has been improving the yield in the spermatogenic process by decreasing cellular loss, although, it did not increase the support capacity of the Sertoli cells.

Keywords: Spermatogenesis. Bovine. Zebu. Testis. Daily spermatid production.

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais de bovinos do mundo, atingindo em 2010 um efetivo de mais de 209,5 milhões de animais, com um aumento de 2,1% em relação ao ano de 2009 (IBGE, 2010). Estima-se que cerca de 80% deste efetivo seja composto por animais de raças zebuínas e seus mestiços, evidenciando sua grande adaptabilidade às condições ambientais e sua importância no cenário nacional.

Inicialmente destacava-se a rusticidade e adaptabilidade dos touros zebuínos às condições brasileiras, entretanto, também se relatava seu desenvolvimento bem mais tardio em relação às raças europeias (Vale Filho et al., 1986). Atualmente tem-se percebido grande avanço no melhoramento genético dos animais zebuínos, o que tem encurtado a distância entre os índices produtivos destes em relação às raças europeias. Este efeito pode ser percebido na redução da idade à puberdade e maturidade sexual observada em rebanhos zebuínos, mesmo naqueles criados extensivamente (Vasconcelos et al., 2003; Brito et al., 2004; Martins et al., 2011), assim como no aumento do perímetro escrotal observado em rebanhos selecionados (Vasconcelos et al., 2003; Corrêa et al., 2006; Viu et al., 2006; Martins et al., 2011; Neves et al., 2011).

Apesar da grande importância dos zebuínos em regiões de clima tropical, existem poucos estudos publicados relativos ao processo espermatogênico destes animais, destacando-se o trabalho de Cardoso (1981), que descreveu detalhadamente a cinética e quantificação da espermatogênese em touros Nelore. Apesar do processo espermatogênico de touros Nelore ter sido muito bem descrito por esse autor, já se passaram muitos anos de melhoramento genético aplicados nesta raça, portanto, é aceitável que alguns resultados obtidos já tenham sido superados. Por outro lado, são raras as publicações descrevendo o processo espermatogênico de touros de outras raças zebuínas, que apesar de ter menor contribuição no efetivo total de bovinos, no Brasil, são raças que participam efetivamente deste contexto, principalmente em cruzamentos com raças europeias.

Não foi encontrado qualquer artigo que tivesse realizado uma análise comparativa do processo espermatogênico de touros de diferentes raças zebuínas na literatura consultada, fato que motivou a realização deste estudo.

A análise histológica quantitativa da espermatogênese pode ser utilizada no estabelecimento de padrões cinéticos celulares como a divisão e renovação de espermatogônias; na quantificação numérica das células germinativas e de Sertoli; para estimar a capacidade de suporte das células de Sertoli nas várias etapas ao longo do processo espermatogênico; no cálculo do rendimento da espermatogênese em suas várias etapas (Castro et al., 1997); e ainda, permite estimar a produção espermática diária a partir da contagem de espermátides arredondadas (Amann, 1981, Johnson et al., 2000).

Estes padrões fornecem ainda, subsídios para o conhecimento de uma gama de particularidades da biologia reprodutiva das diferentes espécies (Fawcett et al., 1973), e parâmetros para o estudo dos efeitos de fármacos e tóxicos no processo espermatogênico (Castro et al., 1997).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar alguns parâmetros da espermatogênese tais como: a população de células germinativas e de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, o rendimento intrínseco da espermatogênese e as perdas celulares nas diversas fases da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular, comparativamente entre bovinos de cinco raças zebuínas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais, colheita dos testículos e aferição da biometria testicular

Foram colhidos testículos de 31 touros zebuínos, puros de origem (PO), das raças Nelore (n=10), Nelore Mocho (n=6), Gir (n=5), Guzará (n=5) e Tabapuã (n=5), com média e amplitude de idade de 6,3 (4-9); 7,4 (6-9); 8,4 (7-10); 7,0 (4-9) e 7,6 (6-9) anos, respectivamente.

Todos os animais foram, inicialmente, submetidos a exame andrológico completo, certificando-se que não possuíam qualquer alteração detectada ao exame clínico dos órgãos genitais e avaliação do sêmen. Foram selecionados somente touros sexualmente maduros e que apresentaram ejaculado com, no mínimo, 50% de motilidade espermática progressiva e morfologia espermática com no máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos menores (Garcia et al.,

1987). A média de peso corporal foi de 575,6; 540,7; 483,4; 466,2 e 466,0 kg para os animais das raças Nelore, Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã, respectivamente.

Os animais selecionados foram orquiectomizados e todos os testículos foram colhidos, separados dos respectivos epidídimos e pesados em balança de precisão. Um testículo de cada animal foi congelado e, posteriormente, dissecado para determinação do percentual ocupado pela túnica albugínea e mediastino. O peso médio de cada testículo foi de 372,8; 332,8; 291,2; 302,4 e 298,0 g, para as raças Nelore, Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã, respectivamente. Descontado o peso da túnica albugínea e mediastino, o peso do parênquima testicular foi de 342,2; 305,3; 267,2; 277,2 e 273,6 g, respectivamente, para as raças analisadas.

3.2.2 Processamento histológico

Imediatamente após a dissecação do epidídimo e pesagem, um dos testículos de cada animal foi perfundido, para fixação, com solução de Karnovsky. Fragmentos testiculares de 2,0 x 5,0 x 5,0 mm foram coletados e incluídos em glicol metacrilato segundo Costa et al. (2004). Foram realizados cortes histológicos de quatro micrômetros (4 μm) de espessura utilizando-se navalha de vidro em micrótomo rotativo. Os cortes histológicos foram corados com solução de azul de toluidina – borato de sódio a 1%, e as lâminas montadas com Entellan[®] (Merck).

3.2.3 População celular dos túbulos seminíferos (no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero)

A população de cada tipo celular do epitélio seminífero foi estimada a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e dos nucléolos das células de Sertoli, em 20 seções transversais do túbulo seminífero, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES), caracterizado pelo método da morfologia tubular (Ortavant et al., 1977). Os seguintes tipos celulares foram contados: espermátogônias do tipo “A” (Sptg A); espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L); espermatócitos primários em paquíteno (PQ); espermátides arredondadas (AR) e células de Sertoli (S).

A contagem obtida foi corrigida para o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann

(1962a). Uma vez que as células de Sertoli possuem núcleo irregular, a correção do número das mesmas foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio.

O diâmetro nuclear ou nucleolar médio foi aferido pela média das mensurações de 10 núcleos de cada tipo de célula germinativa ou 10 nucléolos de células de Sertoli, no estágio 1 do CES, em cada animal. Uma vez que as “Sptg A” possuem núcleos ovóides ou ligeiramente alongados, foi utilizada a média entre o maior e o menor diâmetro nuclear das mesmas para este cálculo.

A contagem da população celular do epitélio seminífero bem como a mensuração do diâmetro nuclear ou nucleolar médio foram feitas com auxílio do *software* de morfometria “ImageJ 1.34s” (Rasband, 2005), utilizando-se imagens microscópicas digitalizadas.

3.2.4 Rendimento intrínseco da espermatogênese

O rendimento intrínseco da espermatogênese foi estimado a partir das razões encontradas entre os números celulares corrigidos de células germinativas, obtidas por secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 do CES. As seguintes razões foram calculadas: a) coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais: razão entre o número de PL/L e o número de Sptg A; b) rendimento meiótico: razão entre o número de AR e o número de PQ; c) rendimento geral da espermatogênese: razão entre o número de AR e o número de Sptg A; d) ocorrência de perdas celulares durante a prófase meiótica: razão entre o número de PL/L e o número de PQ.

3.2.5 Percentual de perdas durante as divisões celulares

Foram calculadas as perdas durante a mitose, durante a meiose, e as perdas totais durante a espermatogênese, considerando o rendimento teoricamente esperado, no qual um animal com seis gerações espermatogônicas teria o potencial de produzir 64 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e 256 espermátides arredondadas (Costa et al., 2011).

3.2.6 Índices de células de Sertoli

O índice de células de Sertoli foi determinado a partir das seguintes razões encontradas entre os números corrigidos de células germinativas e o número corrigido de células de Sertoli, obtidas no estágio 1 do CES: Sptg A:S; PL/L:S; PQ:S; AR:S e total de células germinativas (Sptg A + PL/L + PQ + AR):S.

3.2.7 Cálculo da produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular

A produção espermática diária foi estimada através do volume de túbulos seminíferos, número corrigido de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES, duração do ciclo do epitélio seminífero, área de secção transversal de túbulo seminífero e espessura do corte histológico, segundo Amann e Almquist (1962).

A produção espermática diária por grama de parênquima testicular foi obtida pela divisão da produção espermática diária total pelo peso do testículo descontado o peso da túnica albugínea e mediastino.

3.2.8 Análise estatística

Os cálculos das médias e desvios padrão foram realizados com auxílio da função estatística do programa *Microsoft Office Excel*. As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey através do programa estatístico *BioEstat 3.0* (Ayres et al., 2003). O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS

A população dos diferentes tipos celulares no estágio 1 do CES estimada nas cinco raças zebuínas estudadas, está demonstrada na Tabela 1.

O número médio de Sptg A, por secção transversal do túbulo seminífero, variou discretamente nas raças estudadas, com amplitude de 1,85, na raça Nelore, até 2,02 na raça Tabapuã, não diferindo ($p > 0,05$) entre as raças avaliadas (Tabela 1). Apesar disso, a população de espermatócitos primários em PL/L e em PQ, assim como de AR, foi maior na raça Nelore que nas raças Gir, Guzerá e Tabapuã

($p < 0,05$), não diferindo apenas da raça Nelore Mocho. Estas últimas não apresentaram diferenças entre si (Tabela 1).

Tabela 1. População dos diferentes tipos celulares por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros de diferentes raças zebuínas*.

Raça	S	Sptg A	PL/L	PQ	AR
Nelore	4,22 ^a	1,85 ^a	38,30 ^a	38,14 ^a	113,30 ^a
Nelore Mocho	4,17 ^a	1,93 ^a	33,67 ^{ab}	36,43 ^{ab}	101,38 ^{ab}
Gir	3,98 ^a	1,98 ^a	29,24 ^b	33,48 ^b	90,04 ^b
Guzerá	4,16 ^a	2,00 ^a	29,40 ^b	32,66 ^b	93,18 ^b
Tabapuã	3,86 ^a	2,02 ^a	28,00 ^b	31,94 ^b	88,52 ^b
Média ± DP	4,10 ± 0,34	1,94 ± 0,27	32,85 ± 5,79	35,17 ± 3,52	100,00 ± 12,65

S – células de Sertoli; Sptg A – espermatogônias do tipo A; PL/L – espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno; PQ - espermátocitos primários em paquíteno; AR – espermátides arredondadas. Em unidades.

* Valores corrigidos segundo Amann (1962a).

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na Tabela 2 observa-se as razões entre populações de células germinativas pelas quais pode-se estimar o rendimento da mitose espermatogonial (PL/L :Sptg A), o rendimento da meiose (AR:PQ), o rendimento geral da espermatogênese (AR:Sptg A) e as perdas celulares ocorridas durante a prófase meiótica (PQ:PL/L).

O rendimento da mitose espermatogonial foi maior ($p < 0,05$) na raça Nelore em comparação com os animais Gir, Guzerá e Tabapuã, com superioridade acima de 30%, no entanto, não diferiu da razão observada na raça Nelore Mocho. Entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã não se observou diferença ($p > 0,05$), com discreta variação entre as três últimas.

O rendimento da meiose foi muito semelhante entre as raças estudadas, com razão média entre AR e PQ de $2,84 \pm 0,23$, não apresentando diferenças significativas.

Os animais da raça Nelore apresentaram rendimento geral da espermatogênese significativamente maior que aqueles da raça Gir e Tabapuã, com valores médios acima de 26% em comparação a estas raças, porém, não diferiram das raças Nelore Mocho e Guzerá. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã.

Não se observaram perdas durante a prófase meiótica em qualquer uma das raças estudadas, com razão média de $1,09 \pm 0,12$ entre PQ e PL/L nas raças avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2. Razões entre números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros de diferentes raças zebuínas*.

Raça	PL/L : Sptg A	AR : PQ	PQ : PL/L	AR : Sptg A
Nelore	21,2 ^a	3,0 ^a	1,0 ^a	62,4 ^a
Nelore Mocho	18,0 ^{ab}	2,8 ^a	1,1 ^a	53,8 ^{ab}
Gir	14,8 ^b	2,7 ^a	1,2 ^a	46,0 ^b
Guzerá	15,1 ^b	2,9 ^a	1,1 ^a	47,7 ^{ab}
Tabapuã	14,2 ^b	2,8 ^a	1,2 ^a	45,0 ^b
Média \pm DP	17,40 \pm 4,56	2,84 \pm 0,23	1,09 \pm 0,12	52,92 \pm 11,77

Sptg A – espermatogônias do tipo A; PL/L – espermátócitos primários em pré-leptóteno/ leptóteno; PQ - espermátócitos primários em paquíteno; AR – espermátides arredondadas.

* Valores corrigidos segundo Amann (1962a).

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os valores percentuais de perdas celulares durante as divisões das células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do CES, estão discriminados na Tabela 3. Nota-se que as menores perdas, durante a mitose, foram observadas na raça Nelore, não diferindo ($p > 0,05$) apenas da raça Nelore Mocho. Embora esta última tenha apresentado percentual numericamente menor de perdas, em comparação com as raças Gir, Guzerá e Tabapuã, não se constatou diferença significativa entre elas.

Apesar do percentual de perdas celulares durante a meiose ser numericamente inferior na raça Nelore, não houve significância nos valores encontrados entre os animais das raças avaliadas.

As perdas celulares totais durante a espermatogênese chegaram a uma média, entre as raças, de 79% do potencial teórico. A raça Nelore foi a que apresentou menor percentual de perdas celulares totais, porém não diferiu significativamente das raças Nelore Mocho e Guzerá. As raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã apresentaram variações discretas entre si, não havendo significância estatística.

O índice de células de Sertoli encontra-se apresentado na tabela 4. Nota-se que houve pouca variação entre as raças obtidas, não havendo significância entre as raças.

Tabela 3. Percentual de perdas celulares durante as divisões das células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros de diferentes raças zebuínas.

Raça	Perdas durante a mitose (%)	Perdas durante a meiose (%)	Perdas totais durante a espermatogênese (%)
Nelore	67,0 ^a	25,6 ^a	75,6 ^a
Nelore Mocho	71,9 ^{ab}	30,1 ^a	79,0 ^{ab}
Gir	76,9 ^b	32,5 ^a	82,0 ^b
Guzerá	76,4 ^b	28,7 ^a	81,4 ^{ab}
Tabapuã	77,9 ^b	30,7 ^a	82,4 ^b
Média ± DP	72,81 ± 7,12	28,90 ± 5,85	79,33 ± 4,60

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

A produção espermática diária, por testículo e por grama de parênquima testicular, está representada na Tabela 5. Os animais da raça Nelore apresentaram produção espermática total maior ($p < 0,05$) que as outras raças, que não diferiram entre si, estes valores foram compatíveis com a diferença de peso do parênquima testicular observado entre as raças.

Tabela 4. Razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, de touros de diferentes raças zebuínas (por secção transversal de túbulos seminíferos)*.

Raça	AR : S	PQ : S	PL/L : S	Sptg A : S	TCG : S
Nelore	27,11 ^a	9,13 ^a	9,18 ^a	0,44 ^a	46,87 ^a
Nelore Mocho	24,59 ^a	8,86 ^a	8,19 ^a	0,47 ^a	43,10 ^a
Gir	22,64 ^a	8,44 ^a	7,38 ^a	0,50 ^a	39,95 ^a
Guzerá	22,49 ^a	7,89 ^a	7,12 ^a	0,49 ^a	39,00 ^a
Tabapuã	22,95 ^a	8,29 ^a	7,29 ^a	0,53 ^a	40,06 ^a
Média ± DP	24,5 ± 3,5	8,6 ± 1,2	8,1 ± 1,6	0,48 ± 0,08	42,7 ± 6,0

S – células de Sertoli; A – espermatogônias do tipo A; PL/L – espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno; PQ - espermátocitos primários em paquíteno; AR – espermátides arredondadas; TCG – total de células germinativas. * Valores corrigidos segundo Amann (1962a),

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os animais da raça Nelore apresentaram média de produção espermática diária por grama de parênquima testicular, 17,7; 14,6 e 19,5% maior que a das raças Gir, Guzerá e Tabapuã, respectivamente ($p < 0,01$), não diferindo significativamente quando comparados com animais da raça Nelore Mocho. Os resultados obtidos nas raças Nelore Mocho, Gir e Guzerá não apresentaram variação significativa ($p > 0,05$). A raça Tabapuã foi a que apresentou menor produção espermática por grama de parênquima testicular, significativamente menor que as raças Nelore e Nelore Mocho, mas não diferiu das raças Gir e Guzerá.

Tabela 5. Produção espermática diária total ($\times 10^9$) e por grama de parênquima testicular ($\times 10^6$) de touros de diferentes raças zebuínas.

Raça	Produção espermática diária total*	Produção espermática diária/g de parênquima testicular**
Nelore	22,1 ^a	32,8 ^a
Nelore Mocho	18,2 ^b	30,2 ^{ab}
Gir	14,2 ^b	27,0 ^{bc}
Guzerá	15,4 ^b	28,0 ^{bc}
Tabapuã	14,2 ^b	26,4 ^c
Média \pm DP	18,3 \pm 4,2	30,0 \pm 3,1

* Produção espermática diária total dos dois testículos.

** Calculado segundo Amann e Almquist (1962).

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

O número corrigido de células de Sertoli e espermatogônias tipo “A” por secção transversal de túbulo seminífero não diferiram ($p > 0,05$) entre as raças trabalhadas. Os valores de espermatogônias tipo “A” foram semelhantes ao relatado na raça Nelore ($2,07 \pm 0,18$) por Cardoso (1981), e também em animais mais jovens (24 ± 5 meses) das raças Hereford e Angus ($1,80 \pm 0,1$; Berndtson e Desjardins, 1974). Valores ligeiramente inferiores foram observados por Santos et al. (1999) ($1,54 \pm 0,15$), porém, os animais utilizados foram zebuínos, do grupo controle de seu estudo, aparentemente animais comuns, não submetidos a processo de seleção para melhoramento de características reprodutivas. Por outro lado, quando se compara com os números observados por Amann (1962a,b) em animais taurinos da raça Holandesa ($3,10 \pm 0,1$), percebem-se maiores diferenças.

Estudos comparativos entre espécies diferentes tem demonstrado grande variação do número de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero (França e Russell, 1998). Entretanto, tal variação não se repete quando se comparam os valores encontrados de células de Sertoli entre indivíduos de raças diferentes, visto que essas células apresentam uma capacidade de suporte de células germinativas específica para cada espécie (Russell e Peterson, 1984; França e Russell, 1998), e seu número total por testículo, estabelecido durante o desenvolvimento testicular, se mantém estável após a puberdade (Courrot et al., 1970).

O número de PL/L, PQ e AR encontrado na raça Nelore foi significativamente maior que nas raças Gir, Guzerá e Tabapuã, e estes foram semelhantes àqueles relatado por Cardoso (1981) em touros da raça Nelore, e superiores em, aproximadamente, 26 (PL/L), 38 (PQ) e 19% (AR) em comparação aos animais zebuínos estudados por Santos et al. (1999). Animais da raça Holandesa apresentaram números de PL/L, PQ e AR mais elevados em relação à raça Nelore do presente estudo, porém, mantiveram a mesma proporção de aumento destas células a partir das espermatogônias do tipo "A" (Amann, 1962a,b). Esses resultados demonstram superioridade da raça Nelore em termos de número de células germinativas quando comparada às raças Gir, Guzerá e Tabapuã, e também aos animais da raça Nelore avaliados anteriormente por Cardoso (1981).

Nota-se que a raça Nelore apesar de apresentar número semelhante de espermatogônias do tipo "A", apresentou significativamente maior número de PL/L, PQ e AR em comparação às raças Gir, Guzerá e Tabapuã. Sugere-se que tal fato pode estar relacionado a um menor volume de degenerações celulares no processo espermatogênico (Costa e Paula, 2003, França et al., 2005). A superioridade observada, nestes termos, da raça Nelore, pode ser atribuída à maior intensidade de seleção aplicada à mesma. Este fato pode ser facilmente percebido quando se analisam os sumários de touros no Brasil. Em 1984 apenas 395 touros Nelore, e nenhum das raças Gir, Guzerá e Tabapuã foram avaliados. Já em 2006, foram avaliados 30.820 touros da raça Nelore, e apenas 3.067 Gir, 3.267 Guzerá e 2.025 da raça Tabapuã (Rosa et al., 2009). Além disso, no ano de 2011 foram comercializadas, 3.017.815 doses de sêmen da raça Nelore, contra 258.868 do Nelore Mocho, 13.041 do Gir, 169.335 do Guzerá e 84.061 do Tabapuã (ASBIA, 2011).

A eficiência do processo espermatogênico pode ser avaliada através das razões obtidas a partir do número de células germinativas por secção transversal no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (Costa et al., 2004, Azevedo et al., 2010, Costa et al., 2011). Teoricamente, em cada divisão dobra-se o número de células, porém, isso não é observado na prática, já que o processo espermatogênico é cumulativamente afetado por degenerações celulares (Berndtson et al., 1987).

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais é uma quantificação do rendimento mitótico da espermatogênese e, conseqüentemente, das perdas celulares ocorridas durante a fase espermatogonial. Estas perdas referem-se às apoptoses densidade dependentes, que visam a adequação da população de células germinativas à capacidade de suporte das células de Sertoli (De Rooij e Lok, 1987; Sharpe, 1994).

Teoricamente, em uma espécie com seis gerações espermatogônicas, cada espermatogônia do tipo “A” tem potencial de originar 64 espermatócitos primários durante as divisões mitóticas.

Nos animais da raça Nelore avaliados no presente estudo ocorreu rendimento mitótico superior ao da raça Nelore Mocho, porém sem significância e, em média, 31% maior que nas raças Gir, Guzerá e Tabapuã. O rendimento observado nestas três últimas raças foram aproximados ao observado nos animais zebuínos avaliados por Santos et al. (1999). Cardoso (1981) relatou rendimento das mitoses espermatogoniais de 15,07; com perdas celulares de 76,5% em touros Nelore, rendimento este inferior ao observado nos animais da raça Nelore e semelhante às raças Gir, Guzerá e Tabapuã do presente estudo (Tabelas 2 e 3). Amann (1962a,b) observou rendimento de cerca de 18 PL/L para cada espermatogônia do tipo “A” em animais da raça Holandesa, valor este, semelhante à raça Nelore Mocho no presente estudo. No estudo de Amann (1962a,b) as perdas espermatogoniais somaram, em média, 71,8%, perdas estas superiores ao observado na raça Nelore e inferiores às raças Gir, Guzerá e Tabapuã do presente estudo.

O rendimento mitótico nas cinco raças analisadas teve amplitude de 14,2 a 21,2 espermatócitos primários em PL/L produzidos para cada espermatogônia do tipo “A”, valores compatíveis com o observado na maioria dos animais domésticos (14,6 a 24,8; França e Russell, 1998).

O rendimento meiótico refere-se à eficiência das divisões meióticas durante o processo espermatogênico. Embora teoricamente um espermatócito primário possa

produzir quatro espermátides, perdas de 5 a 30% são comumente observadas ao final da meiose nos animais domésticos (França e Russell, 1998).

O rendimento da meiose não diferiu significativamente entre as raças estudadas, com perdas celulares de 25,6 a 30,7% (Tabelas 2 e 3). Apesar destes resultados se enquadrarem na faixa de variação observada nos animais domésticos (França e Russell, 1998), percebe-se que os animais da raça Nelore apresentaram, numericamente, melhor rendimento e menores perdas celulares. Resultados semelhantes foram observados por Cardoso (1981) em touros da raça Nelore. Rendimento meiótico muito expressivo foi observado por Amann (1962a,b) em animais da raça Holandesa (AR:PQ de 3,74), com perdas celulares de apenas 6,5%. Nos animais zebuínos avaliados por Santos et al. (1999), apesar do rendimento das mitoses não ter sido expressivo, a razão AR:PQ foi de 3,6; com perdas de apenas 10%, muito abaixo dos resultados observados no presente estudo.

Os espermátocitos primários formados a partir das espermatogônias do tipo “B”, iniciam a prófase meiótica e migram para o compartimento adluminal, onde concluem as divisões meióticas, culminando com a produção de espermátides arredondadas (Sharpe, 1994). Durante a prófase meiótica é esperado que as perdas celulares sejam insignificantes, como observado tanto em bovinos quanto em outras espécies domésticas estudadas (França e Russell, 1998). No presente estudo, a razão entre PQ e PL/L foi próxima de 1 para todas as raças avaliadas, com média de $1,09 \pm 0,12$; não se observando perdas nesta fase, resultados que corroboram estudo de Cardoso (1981) na raça Nelore, Amann (1962a,b) na raça Holandesa e Santos et al. (1999) em animais zebuínos.

O rendimento geral da espermatogênese avalia a eficiência do processo espermatogênico como um todo e representa o montante de espermatozóides produzidos a partir de uma única espermatogônia do tipo “A”. Nos animais com seis gerações espermatogônicas, cada espermatogônia do tipo “A” teria potencial de gerar 256 espermátocitos primários.

No presente estudo, apesar dos animais da raça Nelore apresentarem rendimento geral da espermatogênese, numericamente, muito acima das demais raças zebuínas avaliadas, estes foram significativos somente em relação às raças Gir e Tabapuã (Tabelas 2 e 3).

Não foram detectadas diferenças ($p > 0,05$) entre as raças Nelore Mocho, Gir, Guzerá e Tabapuã nos cálculos de rendimento e perdas totais da espermatogênese.

Cardoso (1981) observou razão AR:Sptg A de 44,3 (perdas celulares de 82,7%) em touros Nelore, valores comparáveis somente às raças Gir e Tabapuã, as quais apresentaram as maiores perdas celulares entre as raças avaliadas no presente estudo. Os touros zebuínos avaliados por Santos et al. (1999) apresentaram razão AR:Sptg A de 47,7 (perdas totais de 81,3%), valores inferiores aos observados nos animais Nelore do presente estudo. Amann (1962a,b), em touros Holandeses, observou rendimento geral da espermatogênese de 65,1 espermátides para cada espermatogônia do tipo "A", que equivale a perdas de 74,5%, rendimento este, discretamente maior que os touros Nelore do presente estudo.

Estudos anteriores demonstraram que durante o processo espermatogênico ocorrem importantes perdas celulares por apoptose em todas as espécies estudadas. Os maiores índices de perdas celulares ocorrem durante as mitoses espermatogoniais, atingindo 72 a 79% nos bovinos, seguido das perdas durante as fases finais das divisões meióticas, geralmente em torno de 25%, obtendo-se perdas celulares totais durante a espermatogênese de aproximadamente 78-79% em bovinos. Durante a prófase meiótica e a espermiogênese não se observam perdas importantes (Amann, 1970; Berndtson e Desjardins, 1974, Cardoso e Godinho, 1985). Desta maneira, nota-se que os valores obtidos no presente estudo foram compatíveis com estudos anteriores.

Comparando os animais da raça Nelore avaliados por Cardoso (1981) com estes do presente estudo, percebe-se que houve grande avanço nos índices de rendimento da espermatogênese nesta raça e, considerando que o número de espermatogônias do tipo "A" foram equivalentes entre os experimentos, pode-se concluir que este avanço foi motivado por uma diminuição importante das perdas por degenerações celulares, provavelmente em decorrência do processo seletivo aplicado.

O índice de células de Sertoli é o maior indicativo da eficiência funcional destas células para uma dada espécie, e pode ser interpretado como sendo a capacidade de suporte das células de Sertoli (Russell e Peterson, 1984), ou seja, o número de células germinativas que uma célula de Sertoli pode dar suporte estrutural e nutricional. Portanto, como um índice da eficiência da produção espermática, este consiste no melhor indicativo da eficiência funcional das células de Sertoli (França e Russell, 1998).

Nota-se que apesar da raça Nelore apresentar melhor rendimento da espermatogênese em comparação às raças Gir e Tabapuã, e maior produção espermática diária por grama de testículo que as raças Gir, Guzerá e Tabapuã, não houve diferença significativa no índice de células de Sertoli, e, conseqüentemente, na capacidade de suporte destas células. Sugere-se que o processo seletivo aplicado foi capaz de diminuir o número de degenerações das células espermatogênicas principalmente na raça Nelore, mas não alterou, de forma significativa, a capacidade de suporte das células de Sertoli entre as raças zebuínas.

Considerando que durante o processo espermiogênico não há perdas significativas (Russell e Clermont, 1977), o número de AR presentes no estágio 1 do CES pode indicar a quantidade de espermatozoides a ser produzida. A produção espermática diária por grama de testículo é o parâmetro mais efetivo e de fácil comparação entre as espécies, pois elimina a diferença exercida pelo volume testicular e duração da espermatogênese.

No presente estudo, animais da raça Nelore apresentaram produção espermática diária por grama de parênquima testicular significativamente maior que nas raças Guzerá, Gir e Tabapuã. Estes valores foram muito superiores ao observado em touros Nelore ($13,0 \times 10^6$; Cardoso, 1981), em touros da raça Holandesa ($17,7 \times 10^6$; Amann e Almquist, 1962) e em touros Shorthorn ($16,9 \times 10^6$; de 17-18 meses de idade; Swierstra, 1966). As diferenças observadas podem ser atribuídas, em parte, à evolução das raças, proporcionada pelo melhoramento genético aplicado, e também às diferenças de amostragem e metodologia aplicada aos diferentes estudos. A utilização de animais jovens ou sexualmente imaturos pode produzir resultados inferiores, tais como no estudo de Amann e Almquist (1962) e Swierstra (1966).

A produção espermática diária total está diretamente relacionada ao volume testicular, assim, os animais com maior peso do parênquima testicular foram os que apresentaram proporcionalmente maior produção espermática diária.

Analisando os resultados obtidos no presente estudo, nota-se que, apesar de numericamente superiores na raça Nelore, não houve diferença significativa em qualquer dos itens avaliados entre esta e a raça Nelore Mocho. O fato da raça Nelore Mocho ter surgido como uma variedade da raça Nelore padrão, em época não tão remota, com o início dos registros genealógicos no ano de 1969 (Santos, 1998), além da distância genética entre estas duas raças ser de baixa magnitude

(Vozzi et al., 2006), talvez possa justificar tal semelhança. Além disso, atualmente a raça Nelore Mocho é a segunda em comercialização de sêmen no Brasil entre as raças zebuínas (ASBIA, 2011).

3.5 CONCLUSÕES

Os animais da raça Nelore avaliados apresentaram maior população de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do CES, melhor rendimento em todas as fases da espermatogênese e maior produção espermática diária por grama de parênquima testicular em comparação àqueles das raças Gir, Guzerá e Tabapuã.

REFERÊNCIAS

- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.* 94, 238-248.
- Amann, R.P., 1962a. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *Am. J. Anat.* 110, 49-67.
- Amann, R.P., 1962b. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am. J. Anat.* 110 (1), 69-78.
- Amann, R.P., 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., VanDemark, N.L. (Eds). *The testis*: Academic Press, New York.1, pp.433-482.
- Amann, R.P., 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* 2, 37-58.
- Amann, R.P., Almquist, J.O., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 45, 774-781.
- ASBIA, 2011. Índice ASBIA – Importação, exportação e comercialização de sêmen. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. pp.21. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf>> Acessado em 13/03/2012.
- Ayres, M., Ayres Jr. M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. *Bio Estat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém, Sociedade Civil Maniraua, Brasília CNPq.

- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, E.P., Costa, D.S., Peixoto, J.V., 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). Anim. Reprod. Sci. 118, 83-88.
- Berndtson, W.E., Desjardins, C., 1974. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. Am. J. Anat. 140, 167-180.
- Berndtson, W.E., Igboeli, G., Parker, W.G., 1987. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. Biol. Reprod. 37, 60-67.
- Brito, L.F.C, Silva, A.E.D.F., Unanian, M.M., Dode, M.A.N., Barbosa, R.T., Kastelic, J.P., 2004. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. Theriogenology. 62, 1198-1217.
- Cardoso, F.M., 1981. Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebu (*Bos indicus*). Belo Horizonte: UFMG. 208p. Tese (Doutorado em Morfologia) Universidade Federal de Minas Gerais.
- Cardoso, F.M., Godinho, R.P., 1985. Daily sperm production of zebus (*Bos indicus*) estimated by quantitative histology of the testis. Theriogenology. 23, 841-847.
- Castro, A.C.S., Berndtson, W.E., Cardoso, F.M., 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e sua aplicação em estudos da reprodução de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim. 21(1), 25-34.
- Corrêa, A.B., Vale Filho, V.R., Corrêa, G.S.S., Andrade, V.J., Silva, M.A., Dias, J.C., 2006. Características de sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58 (5), 823-830.
- Costa, D.S., Paula, T.A.R., 2003. Espermatogênese em mamíferos, Scientia, Vila Velha, 4 (1-2), 53-72.
- Costa, D.S., Henry, M., Paula, T.A.R., 2004. Espermatogênese de Catetos (*Tayassu tajacu*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56, 46-51.
- Costa, D.S., Macedo, D.B., Santos, M.D., Paula, T.A.R., Faria, F.J.C., 2011. Intrinsic rate of spermatogenesis in free-ranging feral pigs (*Sus scrofa* sp). Anim. Reprod. Sci. 125, 165-169.
- Courot, M., Hochereau-De Reviere, M.T., Ortavant, R., 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., VanDemark, N.L. (eds). *The testis*. New York: Academic Press. 1 (6), 339-432.

- De Rooij, D.G., Lok, D., 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat. Rec.* 217, 131-136.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9, 500-532.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds). *Male reproduction. A multidisciplinary overview.* Churchill Livingstone, Madrid. pp.197-219.
- França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L., 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology.* 63, 300-318.
- Garcia, J.M., Pinheiro, L.E.L., Okuda, H.T., 1987. Body development and semen physical characteristics of Young Guzera bulls. *Ars. Vet.* 3 (1), 47-53.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., 2010. Produção pecuária municipal. Rio de Janeiro. 38, 1-65. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>> Acessado em 14/03/2012.
- Johnson, L., Varner, D.D., Roberts, M.E., Smith, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield, W.L., 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 471-480.
- Martins, J.A.M., Souza, F.A., Ferreira, M.B.D., Gonçalves, P.E.M., Emerick, L.L., Dias, J.C., Leite, T.G., Graça, D.S., Andrade, V.J., Vale Filho, V.R., 2011. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Gir selecionados para produção de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63 (6), 1277-1286.
- Neves, A.L.A., Del Rei, A.J., Santos, M.P., 2011. Crescimento testicular de touros da raça Nelore. *Livestock Research for Rural Development*, 23 (4), 93-100.
- Ortavant, R., Courot, M., Hochereau- De Reviere, M.T., 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds). *Reprod. Dom. Anim.* Academic Press, New York. pp.203-227.
- Rasband, W., National Institute of Health, USA. Software disponível em <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> Acessado em 20/03/2005.
- Rosa, A.N., da Silva, L.O.C., Nobre, P.R.C., Torres Júnior, R.A.A., Amaral, T.B., 2009. Avaliação genética, zootécnica e funcional de touros. In: Amaral, T.B., Sereno, J.R.B., Pellegrin, A.O. *Fertilidade, Funcionalidade e Genética de Touros Zebuínos.* Corumbá: Embrapa Pantanal; Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Planaltina: Embrapa

Cerrados, 216p. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=Livro35> Acessado em 15/05/2011.

Russell, L.D., Clermont, Y., 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.* 187, 347-366.

Russell, L.D., Peterson, R.N., 1984. Determination of the elongate spermatid- Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* 70, 635-641.

Santos, R., 1998. Edição comemorativa dos 60 anos do registro genealógico. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu – ABCZ. pp.856.

Santos, R.L., Silva, C.M., Ribeiro, A.F.C., Vasconcelos, A.C., Pesquero, J.L., Coelho, S.G., Serakides, R., Reis, S.R., 1999. Effect of growth hormone and induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology.* 51, 957-984.

Sharpe, R. M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds). *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, N.Y. pp.1363-1434.

Swierstra, E.E., 1966. Structural composition of Shorthorn bull testes and daily spermatozoa production as determined by quantitative testicular histology. *Can. J. Anim. Sci.* 46, 107-119.

Vale Filho, V.R., Pinheiro, L.E.L., Basrur, P.K., 1986. Reproduction in zebu cattle. In: Morrow, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*. 2. W.B. Saunders Company, Philadelphia pp.437-442.

Vasconcelos, C.O.P., Guimarães, J.D., Guimarães, S.E.F., Costa, E.P., Miranda Neto, T., Dias, F., 2003. Estádio de maturidade sexual em touros da raça Nelore, dos 20 aos 22 meses de idade. *Rev. Bras. Reprod. An.* 27 (2), 174-175.

Viu, M.A.O., Magnabosco, C.U., Ferraz, H.T., Gambarini, M.L., Oliveira Filho, B.D., Lopes, D.T., Viu, A.M.F., 2006. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. *Arch. Vet. Sci.* 11 (3), 53-57.

Vozzi, P.A., Marcondes, C.R., Magnabosco, C.U., Bezerra, L.A.F., Lôbo, R.B., 2006. Structure and genetic variability in Nelore (*Bos indicus*) cattle by pedigree analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (3), 482-485.