



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES

**EFEITO DA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (rbST) NAS
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE OVINOS SANTA INÊS**

Teresina
2015

LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES

**EFEITO DA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (rbST) NAS
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE OVINOS SANTA INÊS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como
parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia, Fisiopatologia,
Biotécnicas da Reprodução e Fisiopatologia do Estresse.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Teresina

2015

Gomes, Leopoldina Almeida

G633e

Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) nas características seminais de ovinos Santa Inês. / Leopoldina Almeida Gomes. / Teresina: UFPI, 2015.

96 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

Orientação: Prof^º. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1. Carneiro 2. Somatotropina 3. Sêmen 4. Criopreservação

I. Título

CDD 636.3089

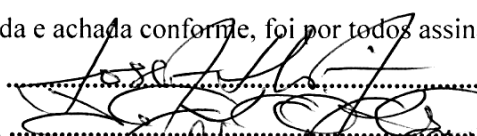
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
 PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
 COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
 NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
 COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

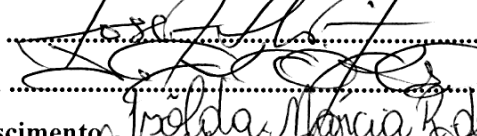
ATA DA DEFESA DE TESE APRESENTADA POR
 LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES

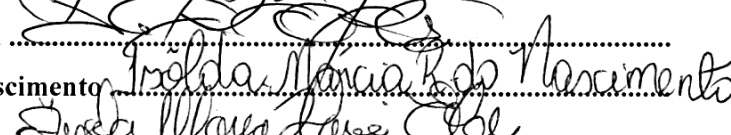
Aos quinze dias do mês de setembro do ano de dois mil e quinze, às 14:30 horas, no Auditório do Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina-PI, a Banca Examinadora infranomeada procedeu ao julgamento da defesa de tese intitulada “Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) nas características seminais de ovinos Santa Inês”, apresentada pela doutoranda LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES, da Área de Sanidade e Reprodução Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, desta Universidade. O Presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, iniciando os trabalhos concedeu a palavra à candidata LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES para uma breve exposição do seu trabalho. Em seguida, o Sr. Presidente concedeu a palavra, pela ordem e sucessivamente, aos examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 (trinta) minutos, assegurando-se à mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimado a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando-a.....**APROVADA**

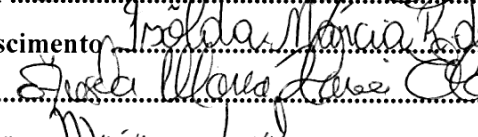
	A / NAp
Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI	(X) ()
Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Interno) / DCCV/CCA/UFPI	(X) ()
Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento (Interna) / CTT/UFPI	(X) ()
Profa. Dra. Ângela Maria Xavier Eloy (Externa) / EMBRAPA/CNPC	(X) ()
Profa. Dra. Tânia Maria Leal (Externa) / EMBRAPA/CPAMN	(X) ()

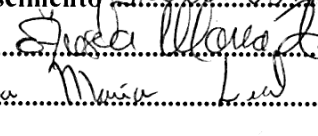
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES.....**APROVADA**..... Nada mais havendo a tratar eu, Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento

Profa. Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

Profa. Dra. Tânia Maria Leal

DEDICO

*A meu **Pai** Antônio, meu porto seguro, experiência e admiração.*

*À minha **Mãe** Graça, amor incondicional, exemplo de humildade e dedicação.*

*À minha **Filha** Bárbara, meu tudo, amiga, e motivo para seguir.*

*Às minhas **Irmãs** Christiane, Verônica, Carmem Lúcia e Raissa, amigas e companheiras de todas as horas.*

*Aos **Sobrinhos** João Vitor, Felipe Gabriel, Isabela, Murilo e Heitor pela pureza e alegrias proporcionadas.*

*A os **Cunhados** Mauro, Nídio, Alisson e Thecio pelos conselhos e incentivos.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí pela minha formação profissional e pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos na área de Médica Veterinária.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelo apoio nas pesquisas, no ensino e capacitação para a minha formação voltada a Docência, Pesquisa e Extensão durante o Mestrado e Doutorado.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) pelo apoio nas análises do experimento utilizando o software CASA, na pessoa do prof.º Dr. José Ferreira Nunes e a equipe do laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) que me auxiliou.

À Embrapa Caprinos e Ovinos pela parceria, permitindo a continuidade de parte desta pesquisa, junto ao Laboratório de Biotecnologia na execução das análises da Proteômica, sob orientação da Dr. Ângela Maria Xavier Eloy e ao Técnico de Laboratório João Ricardo e às Mestrandas Ilana Santos de Galiza e Katiane Freitas dos Santos pelo apoio às atividades realizadas, que muito contribuíram para o meu aperfeiçoamento e ao Dr. Olivardo Facó pela atenção e colaboração na realização das análises estatísticas.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, pela amizade, pelo apoio, orientação, conselhos e formação durante todos esses anos desde a graduação e hoje no doutorado.

A todos os professores do Doutorado em Ciência Animal, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao Prof.º Dr. Willams Costa Neves que foi imprescindível para a realização deste estudo, depositando confiança e colaborando conosco, cedendo os animais experimentais.

À Prof.ª Dr.ª Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro pela amizade e apoio na execução do experimento, sempre contribuindo com alguns materiais, por sua força, fé e conselhos para irmos à busca dos nossos objetivos e nunca desistir.

Á minha amiga Prof.^a Dr.^a Isolda por sua amizade, alegria e fé, que muito me ajudou, desde o começo com a idealização desse trabalho, pelas horas de estudo, na seleção dos animais, análises e elaboração da versão final.

Á minha amiga e companheira de Pós-Graduação Dr. Yndyra Nayan por sua amizade, grandeza e virtude, inteligência, e disponibilidade para ajudar, estando presente a medida do possível em todas as etapas na construção desta pesquisa, sempre alegre e prestativa.

Ao meu amigo Dr. Felipe Barçante, meu muito obrigado por todos esses anos nas atividades da Pós, sempre me ajudando nas coletas e análises, com seus conhecimentos e por sua amizade e simplicidade.

Aos companheiros de Pós-graduação que formam a equipe do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, pela amizade, troca de conhecimentos, e que de alguma forma colaboraram na execução do projeto: Marlon, Luiz, Deyse, Luana, Ícaro, Filipe Nunes, Felipe Barçante, Felipe de Jesus, Viviany, Micherlene, Jefferson, Savio, Priscila, Siluana, Yelson, Cícero, Jailson, João Mendes, James, Dr. Júnior, Dr. Isolda, Dr. Ney Rômulo, Dr. Adalmir e Bruno Prado que me ajudou na viagem a Embrapa e estadia em Sobral-CE.

Á Residente de Medicina Veterinária da UFPI Sabrina Tabla que me ajudou na execução das análises do CASA realizado na UECE e a acadêmica Dayse Andrade na seleção dos animais.

Ao prof.^o Dr. Amilton Paulo Raposo Costa e a doutoranda Marina Nérica do Nascimento e Silva pela colaboração na execução das análises hormonais no setor de Fisiologia Animal do CCA da UFPI e aos colegas e pós graduandos do LBRÁ que me auxiliaram, Ícaro Torres e Filipe Nunes.

Aos colegas de Pós-Graduação que tive a oportunidade de conviver durante esses anos todos, compartilhando das aulas, cursos realizados pelo programa, troca de experiências e de momentos de descontração.

A todos os funcionários que fazem parte da Instituição e que de alguma forma colaboraram para minha formação, em especial ao Narciso Filho, Sr. Raimundo, D. Noêmia, Luis, Vicente, Celso, Sr. Antonio e Sr. Narciso do Departamento de Zootecnia. da UFPI.

Aos alunos do Colégio Técnico de Teresina (CTT), Maciel e Amanda que colaboraram auxiliando em algumas coletas do projeto.

Á toda a minha família pelo amor, apoio e incentivo para a realização de todos os meus empreendimentos.

Á minha filha Bárbara por seu amor, compreensão, carinho, admiração, sempre acreditando e respeitando meus ideais.

Á Dona Rosário, Sr. Antonio, Ericely, e Ericelma, agradeço pela amizade, carinho, fé e confiança.

Á família Medeiros, em especial a D. Socorro, Socorrinha, Márcia, Lobélia, e Chiquinha por me ajudar sempre, com amor, conselhos e confiança nos meus empreendimentos e por me terem como membro da família.

Á minha amiga Hildeny por sua amizade, sempre me auxiliando com sua fé, otimismo e incentivo.

Ao meu querido Anderson “vida”, por seu amor, carinho, apoio, incentivo, companheirismo e compreensão mesmo estando às longas distâncias, mas perto de alma e coração.

Aos meus amigos da docência Raniel Lustosa, Nilton Andrade, Dulce, Gilson Lages, Maxwell Reis, Artur Arré, Priantti, Mara Ramel.

Em especial e in memoriam, gostaria aqui de agradecer aos Professores Nicodemos Alves quando em vida por sua amizade, seus conhecimentos passados em sala de aula e nas conversas informais nos corredores do CCA e palavras de incentivo para eu iniciar na pesquisa e docência; e ao meu querido orientador de Mestrado Prof. Assis Costa que

muito contribuiu na minha formação como docente, com suas virtudes, sua educação e competência, e por seu amor a pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho dos hospitais pelas palavras de incentivo nas horas difíceis.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Bases Morfofisiológicas do Sistema Reprodutor do Macho.....	20
2.2 Biometria Escrototesticular.....	21
2.3 Características Seminais.....	22
2.4 Criopreservação do Sêmen.....	24
2.5 Crioinjúrias.....	24
2.6 Avaliações Espermáticas.....	27
2.6.1 Estruturas Espermáticas.....	28
2.6.2 Preparação Úmida/Contraste de Fase.....	29
2.6.3 Provas de Integridade da Ultraestrutura Espermática.....	30
2.6.4 Avaliação da Cinética Espermática.....	31
2.7 Hormônio do crescimento (GH).....	32
2.8 Somatotropina bovina recombinante (rbST).....	34
3 CAPÍTULO I: “Características do sêmen fresco e biometria escrototesticular de ovinos Santa Inês tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST)”.....	38
4 CAPÍTULO II: “Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) no sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês”.....	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE.....	80
ANEXO.....	95

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1.	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal na função testicular.....	21
Figura 2.	Desenho esquemático das estruturas do espermatozoide e suas divisões.....	29
Figura 3.	Mecanismo de ação do GH nos testículos.....	34

CAPÍTULO I

Figura 1a.	Comprimento (cm) do testículo direito (CTD) de ovinos tratados ou não com rbST.....	45
Figura 1b.	Largura (cm) do testículo direito (LTD) de ovinos tratados ou não com rbST.....	45
Figura 2.	Comprimento (cm) do testículo esquerdo (CTE) de ovinos tratados ou não com rbST.....	46
Figura 3.	Largura (cm) do testículo esquerdo (LTE) de ovinos tratados ou não com rbST.....	46
Figura 4.	Tempo de cortejo e monta completa dos ovinos tratados e não tratados com rbST nos dias de coletas D0, 14, 28, 42, 56 e 70.....	47
Figura 5.	Motilidade Progressiva (%) do sêmen fresco dos ovinos tratados e não tratados com rbST.....	49

CAPÍTULO II

Figura 1.	TTR quanto ao VIG do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês do grupo T-I nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento das amostras coletadas no D0, 14, 28, 42, 56 e 70.....	62
Figura 2.	TTR quanto ao VIG do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês do grupo T-II nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento das amostras coletadas no D0, 14, 28, 42, 56 e 70.....	62
Figura 3.	TTR quanto ao VIG do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês do grupo T-III nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento das	

	amostras coletadas no D0, 14, 28, 42, 56 e 70.....	
Figura 4.	Espermatozoides criopreservados de ovinos, corados com FITC-PNA, demonstrando acrossoma danificado (A) e íntegros (B) observados em microscópio de epifluorescência em aumento 40X.....	64
Figura 5.	Espermatozoides criopreservados de ovinos, corados com JC-1, apresentando baixo (C) e alto (D) potencial mitocondrial, observados em microscópio de epifluorescência, aumento 40X.....	64

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO I**

Tabela 1.	Perímetro escrotal e volume testicular esquerdo e direito ($x \pm dp$) de carneiros Santa Inês tratados ou não com rbST.....	43
Tabela 2.	Características físicas e morfológicas do sêmen fresco de carneiros Santa Inês tratados ou não com rbST.....	48

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Motilidade e Vigor do sêmen pós-descongelção de ovinos Santa Inês tratados ou não com rbST pelo Teste de Termorresistência ($x \pm CV$) incubado a 37°C nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.....	61
Tabela 2.	Parâmetros da Cinética espermática ($x \pm CV$) do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês tratados ou não com rbST avaliados pelo software CASA.....	63
Tabela 3.	Integridade da membrana plasmática, do acrossoma e potencial mitocondrial dos espermatozoides ($x \pm CV$) de ovinos Santa Inês tratados e não tratados com rbST, corados pelas sondas de fluorescência.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

π – Pi

\bar{x} - Média

χ^2 – Qui-quadrado

μg – Micrograma

μL - Microlitro

°C - Graus Celsius

μm – micrometro

ALH - Deslocamento Lateral de Cabeça

ATP – adenosina trifosfato

BCF - Frequência de Batimento Cruzado

CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis

CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

cm – centímetro

CONC - Concentração

CTD – Circunferência do testículo direito

CTE - Circunferência do testículo esquerdo

CV – Coeficiente de variação

DEFT – Defeitos Totais

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

DMA – Defeitos Maiores

DME – Defeitos menores

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fig. - Figura

FITC-PNA - Isoticianato de fluoresceína - Peanut agglutinin

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

g – Grama

GH – Hormônio do Crescimento

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IA – Inseminação Artificial
IGF – I – Fator de Crescimento semelhante a Insulina
IGFBP – Proteína Ligadora do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-I – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
KDa - Kilodalton
Kg – Kilograma
LBRA – Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal
LDF – Fração de baixa densidade
LH – Hormônio Luteinizante
LIN – Linearidade
LTD – Largura do testículo direito
LTE - Largura do testículo esquerdo
mg - Miligrama
MHz – Megahertz
mL – Mililitro
mm³ – milímetro cúbico
MP – Motilidade progressiva
MT – Motilidade total
MOT – Motilidade
mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
n° - Número
NaCl – Cloreto de sódio
NIB – Núcleo Integrado de Biotecnologia
PE – perímetro escrotal
pH – Ponto hidrogeniônico
PIV – Produção *in vitro*
rbST – Somatotropina bovina recombinante
r² - Raio ao quadrado
ROS – Espécies reativas de oxigênio
s – Segundos
SAS – Statistical Analysis System
SC - Subcutânea

ST - Somatotropina
STR - Retilinearidade
TE – Transferência de embrião
Tris - TRIS (hidroximetil) Amino Metano
TTR – Teste de Termorresistência Rápida
TURB – Turbilhão
UECE – Universidade Estadual do Ceará
UFPI – Universidade Federal do Piauí
UI - Unidades Internacionais
US – Ultrassom
VA – Vagina Artificial
VAP - Velocidade de trajeto
VCL – Velocidade curvilínea
VIG - Vigor
VOL - Volume
VSL - Velocidade progressiva
VTD – Volume testicular direito
W – Oeste
WOB – Índice de oscilação ou wobble

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do rbST na qualidade espermática do sêmen pré e pós-criopreservado de carneiros Santa Inês. Utilizando 18 animais, com idade entre 22 a 36 meses, divididos em três grupos: TI-2mLNaCl 0,9%, TII-100mg/rbST e o TIII-125mg/rbST (BOOSTIN[®] Intervet Schering Plough), via SC, a cada 14 dias (D0, 14, 28, 42, 56, 70). Foram mensurados perímetro escrotal, comprimento, largura e volume testicular. Os ejaculados colhidos por vagina artificial foram avaliados quanto ao volume, turbilhão, motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática. As amostras de sêmen foram diluídas em Tris-Gema, envasadas, congeladas (TK3000) e armazenadas (-196°C). O delineamento foi inteiramente casualizado, utilizando o SAS, com médias comparadas pelo teste t e Tukey-Kramer a 5%. Não houve diferença ($P>0,05$) no PE (30,1cm) e volume médio dos testículos (468,15cm³), e no volume, turbilhão, vigor, defeitos maiores e menores. A motilidade do T-III foi inferior (62,2%), T-I (76,3%) e T-II (76,9%); defeitos totais do T-I (41,93%) superiores; defeitos maiores no T-II e T-III foram < 10% (8,38%; 8.97%). A concentração (espermatozoide/mL) no T-III foi significativa (787,69±480,72) ao T-I (546,81±252,54) e T-II (679,96±23,17). Na avaliação da cinética espermática pelo *software* CASA ($x \pm DP$) pós-descongelção verificou-se que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) quanto os parâmetros analisados (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF). O teste de termorresistência não demonstrou alteração significativa ($p>0,05$) quanto a motilidade e vigor, comparados os grupos, avaliado no 0, 60, 120 e 180 min., 37°C. Quanto ao tempo, foi significativo ($p<0,05$) o vigor do TI (1,65±0,74) apresentando-se bem inferior em comparação com o TII e TIII aos 60 e 120 minutos. No entanto, TIII apresentou melhores resultados, sendo significativo ($p<0,05$) aos 120 minutos (1,8 ±0,59). Quanto à ultraestrutura espermática foi evidenciado efeito significativo ($p<0,05$) nos grupos, nos testes de integridade da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial, utilizando as sondas de epifluorescência, corados com DCF-IP, FITC-PNA e JC-1. Concluiu-se que a aplicação de 100 e 125mg/rbST em ovinos Santa Inês não altera as medidas testiculares e características seminais. A concentração espermática aumenta com a dose de 125mg/rbST. Não altera a cinética, motilidade e vigor dos espermatozoides pós-descongelção. O tratamento com rbST apresentou efeito benéfico, promovendo uma melhoria na integridade da membrana plasmática e do acrossoma.

Palavras-chave: carneiro, somatotropina, sêmen, criopreservação.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of rbST on sperm quality of semen pre and post cryopreserved sheep Santa Ines. Using 18 animals, aged between 22 to 36 months, divided into three groups: T-I-2mLNaCl 0.9%, T-II-100mg / rbST and T-III-125mg / rbST (BOOSTIN®Intervet Schering Plough), subcutaneously, every 14 days (D0, 14, 28, 42, 56, 70). They were measured scrotal circumference, length, width and testicular volume. The ejaculates collected by artificial vagina were evaluated for volume, vortex, motility, vigor, morphology and sperm concentration. Samples of semen were diluted in Tris-Gema, potted, frozen (TK3000) and stored (-196 ° C). The design was completely randomized, using SAS, means were compared by t test and Tukey-Kramer 5%. There was no difference ($P > 0.05$) in PE (30,1cm) and testis volume (468,15cm³), and volume, turmoil, force, major defects and minor. Motility T-III was lower (62.2%), T-I (76.3%) and T-II (76.9%); total defects of T-I (41.93%) above; the major defects in T-II and III were <10% (8.38%; 8.97%). The concentration (sperm / ml) in T-III was significant (787.69 ± 480.72) to T i (546.81 ± 252.54) and T-II (679.96 ± 23.17). In the evaluation of sperm kinetics by CASA software ($x \pm SD$) after thawing it was found that there were no significant differences ($p > 0.05$) as the parameters analyzed (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF). The heat resistance test showed no significant change ($p > 0.05$) as motility and vigor, the groups were compared, assessed at 0, 60, 120 and 180 min., 37 ° C. As for the time, it was significant ($p < 0.05$) vigor of IT (1.65 ± 0.74) presenting much lower in comparison with the TII and TIII at 60 and 120 minutes. However, TIII showed the best results being significant ($p < 0.05$) at 120 minutes (1.8 ± 0.59). As to sperm ultrastructure was evidenced significant effect ($p < 0.05$) in the groups, the integrity tests of the plasma membrane and acrosomal mitochondrial potential, using probes epifluorescence stained with DCF-IP, FITC-PNAs and JC-1 . It was concluded that the application of 100 and 125mg / rbST in Santa Ines sheep does not alter testicular measurements and semen characteristics. The sperm concentration increases with the dose of 125mg / rbST. It does not alter the kinetics, motility and vigor of post-thaw sperm. And treatment had a beneficial effect, promoting an improvement in plasma membrane integrity and acrosome.

Keywords: sheep, somatotropin, semen, cryopreservation

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticados pelo homem, que com sua criação possibilitava alimento e proteção, pelo uso da lã e fibra que servia como abrigo contra as intempéries do ambiente. Sua cultura está presente em praticamente todos os continentes e a ampla difusão da espécie se deve principalmente à rusticidade, capacidade de adaptação destas às diferentes condições ambientais e situações edafoclimáticas rigorosas. Sendo sua produção destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (GUSMÃO; ANDRADE, 2005; VIANA, 2008).

A exploração destas espécies ainda é carente em tecnologias avançadas, em investimento na formação e qualificação de mão de obra. Entretanto, apesar das limitações tem havido uma crescente demanda pela iniciativa privada, com biotécnicas da reprodução animal que visem o melhoramento genético, o incremento da produtividade, rentabilidade dos rebanhos e unidades produtivas (FERRAZ; ELER, 1999; SIMPLÍCIO *et al.*, 2002).

Com o advento das biotecnologias reprodutivas e utilização de novas ferramentas no processo de melhoramento animal aliadas a técnicas tradicionais, muito tem contribuindo para a produção e reprodução, com o propósito de incrementar ainda mais o progresso genético dos animais domésticos (NUNES, 2010). No desenvolvimento da inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), produção *in vitro* (PIV), o sêmen congelado é significativamente importante, principalmente durante o processo de criopreservação, por ser complexo, requerer atenção e conhecimento morfofisiológico de cada espécie. Além dos diversos fatores associados à diluição, congelação e descongelação do sêmen que influenciam na capacidade fertilizante positivamente ou apresentando danos na capacidade funcional dos espermatozoides, pelo choque térmico e estresse osmótico na criopreservação (WATSON, 2000; CASTELO *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2009).

Na tentativa de minimizar esses possíveis efeitos deletérios sobre a célula espermática e qualidade do ejaculado durante a criopreservação, estudos têm buscado determinar as alterações observadas. Dentre as alternativas, o uso parenteral de hormônios tem sido muito utilizado em pesquisas, baseados em efeito direto sobre a gametogênese e esteroidogênese proporcionando efeito mais expressivo sobre a qualidade do sêmen criopreservado (CORRÊA *et al.*, 2009).

Terapias com somatotropina (ST) exógena aumentam a concentração plasmática de IGF-I, principal mediador da ação do hormônio do crescimento, sendo um importante agente mitogênico para as células germinativas e manutenção dos espermatozoides (SCHAMS *et al.*,

1999; SIROTKIN, 2004; VIEIRA *et al.*, 2010), além de melhorar as taxas de fertilização, agindo sobre as características e favorecendo o metabolismo destes (LUCY, 2000).

Segundo Rabassa, (2012) a (ST) pode apresentar um maior desenvolvimento testicular e antecipação da puberdade, sendo utilizada como alternativa em tratamentos reprodutivos. Porém, ainda são escassas pesquisas que determinem os mecanismos de ação deste hormônio sobre a função testicular, a célula espermática, na produção de testosterona e idade à puberdade de cada espécie.

Com a legalização e produção comercial da somatotropina bovina recombinante (rbST) muitos estudos foram desenvolvidos, por ser um bom promotor do crescimento, além de agir na produção e reprodução. Quanto aos riscos à saúde humana e animal, não há indícios de comprometimentos reprodutivos diante de sua utilização. Pode ser uma importante ferramenta, para maximizar o aproveitamento do sêmen de reprodutores com alto mérito genético nos sistemas de produção, além de melhorar a resistência espermática nos processos de congelamento e descongelamento das espécies (CORRÊA *et al.*, 2009).

Diante disso, buscam-se mais pesquisas sobre a qualidade espermática do sêmen *in natura* e criopreservado de ovinos utilizando hormônios protéicos, especificamente o (rbST). E o uso de técnicas que promovam um melhor entendimento do seu mecanismo de ação fisiológica, determinando as características específicas do produto com reflexo positivo na qualidade reprodutiva do macho.

Estruturalmente, esta tese encontra-se organizada em, uma introdução, referencial teórico, dois capítulos, considerações finais e as referências bibliográficas. O referencial teórico corresponde a uma revisão de literatura com categorias descritas a partir de um levantamento de artigos científicos, teses, e dissertações. Os dois capítulos foram elaborados na forma de artigos científicos, sendo, o primeiro, intitulado “**Características do sêmen fresco e biometria escrototesticular de ovinos Santa Inês tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST)**” escrito segundo as normas do Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ISSN:1678-4162), e o segundo, intitulado “**Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) no sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês**” escrito de acordo com as normas do Periódico Small Ruminant Research (ISSN: 0378-4320).

1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Bases Morfofisiológicas do Sistema Reprodutor do Macho

O aparelho genital masculino é composto por testículos, epidídimos, ductos, glândulas sexuais acessórias e pênis. Os testículos localizam-se na região subinguinal em posição pendular, mantidos a uma temperatura inferior a corporal, permitindo condições fisiológicas adequadas para desempenhar a espermatogênese e produção hormonal. Possuem forma alongada e ovalada, envoltos pelas túnicas albugínea e vaginal, recobrando o parênquima testicular, constituído por túbulos seminíferos, tecido conjuntivo e mediastino (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

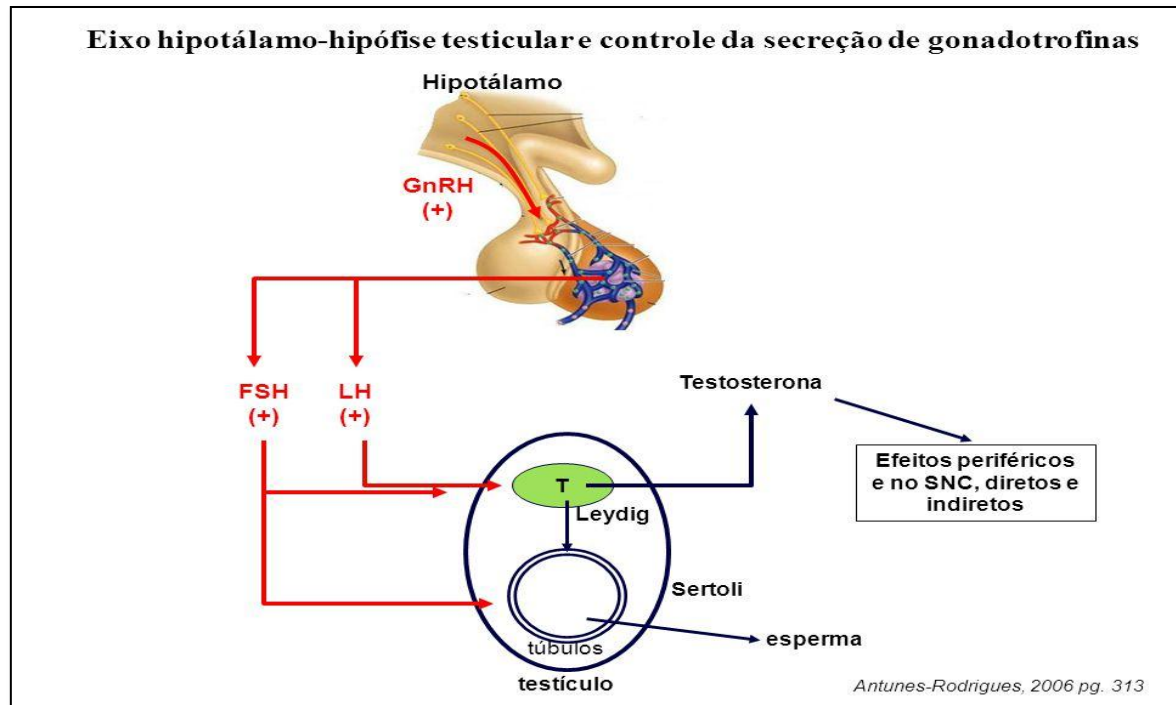
O epidídimo é um tubo coletor aderido aos testículos, dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda. Com funções no transporte, armazenamento, maturação e motilidade dos espermatozoides, aumentando à medida que percorrem o corpo e a cauda a habilidade fertilizante, controladas por mecanismos fisiológicos termorregulatórios e hormonais para sua manutenção (DYCE, 2010). Os ductos deferentes transportam os espermatozoides desde a cauda do epidídimo até a porção pélvica da uretra, sendo armazenadas nas ampolas, porções dilatadas destes que servem como reservatório espermático (HAFEZ, 2004; REECE, 2007; DYCE, 2010).

Os pequenos ruminantes apresentam como glândulas sexuais acessórias (Fig.1): as ampolas, glândulas vesiculares seminais, bulbouretrais e uma próstata, com morfologias variadas, na região pélvica, responsáveis pela produção de fluidos do plasma seminal e volume, fornecendo um ambiente apropriado para a sobrevivência dos espermatozoides (HAFEZ, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O pênis, órgão copulador, é classificado como fibroelástico, apresenta corpo em forma de flexura sigmoide (“S” peniano), revestido pelo prepúcio com função de proteção. Nos ovinos apresenta o processo uretral (apêndice filiforme) que se projeta entre 2 a 3 cm além da glande peniana durante a ejaculação, facilitando a aspensão do ejaculado no interior do trato genital da fêmea, devido ao reduzido volume de sêmen. (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

No controle neuroendócrino reprodutivo destacam-se estruturas importantes como o hipotálamo localizado no tronco encefálico que se comunica com a hipófise, estabelecendo um eixo com as gônadas (Fig.1). Os hormônios hipotalâmicos são liberados por mecanismos de retroalimentação podendo exercer um efeito positivo (liberador) ou negativo (inibidor). Sintetiza e secreta hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) atuando na

adenohipófise estimulando a secreção do hormônio luteinizante (LH) e o folículo-estimulante (FSH), atuando diretamente nos testículos. Além da testosterona, produzida pelas células de Leydig sob estímulo do LH, sendo o principal hormônio responsável pela produção e manutenção de espermatozoides controlados pela espermatogênese e esteroidogênese.

Figura 1. Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal na função testicular.



Fonte: Rodrigues, A., 2006.

A sazonalidade e o fotoperíodo, caracterizados pelo efeito da incidência de luz sobre o desempenho reprodutivo, também é um fator relevante e observado em algumas espécies, como nos ovinos, caprinos, búfalos, equinos e aves. O número de horas em exposição à luz exerce influência hipotalâmica, modifica a secreção dos hormônios hipofisários gonadotrópicos, mediante a ação da melatonina, que é um hormônio produzido pela glândula pineal com forte influência no fotoperíodo e controle neuroendócrino da atividade reprodutiva, aumentando a atividade sexual principalmente nos dias curtos, de pouca luminosidade (HAFEZ, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.2. Biometria Escrototesticular

As avaliações biométricas do trato reprodutivo dos machos fornecem um modelo útil para uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva e seleção destes como reprodutores, sendo o perímetro escrotal (PE) a medida mais utilizada, apresentando correlação positiva

com o peso testicular e corporal, além de exibir altas correlações com produção e qualidade espermática (LÔBO *et al.*, 1997; MESQUITA, 2004; MARTINS *et al.*, 2008).

As principais características são a fácil mensuração, a média a alta herdabilidade e repetibilidade (SNOWDER *et al.*, 2002), estando menos sujeita a possíveis erros na mensuração e interpretação, e a correlação com as demais medidas biométricas como: comprimento, largura, peso e volume testicular (FORNI; ALBUQUERQUE, 2004). Segundo Pacheco *et al.*, (2010) tanto o PE quanto o volume testicular não devem ser usados como critério único para a escolha de reprodutores, necessitando associá-los a outras características como peso corporal, ao exame clínico geral e andrológico, garantindo uma escolha mais eficiente.

Souza, (2003) relatou a existência de associações entre medidas testiculares, parâmetros quantitativos da espermatogênese, idade à puberdade e desenvolvimento corporal em carneiros Santa Inês. Há também evidências de que o epidídimo seja crucial para a maturação espermática (DACHEUX; DACHEUX, 2002) e que as secreções das glândulas sexuais acessórias influenciam várias funções espermáticas como a capacitação, reação acrossômica e na motilidade (WAY *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2007a), além de provavelmente interferir na fertilização (MOURA *et al.*, 2007b).

2.3. Características Seminais

O sêmen é formado por uma porção sólida de células espermáticas e uma fração líquida, denominada de plasma seminal, constituído principalmente de água e substâncias orgânicas, proteínas, gorduras, açúcares e sais (MYES FILHO; BARRETO, 1949).

O plasma seminal dos mamíferos corresponde a um complexo de secreções compostas por fluidos moleculares capazes de afetar a função espermática desde a maturação até a fertilização no trato reprodutivo da fêmea (YANAGIMACHI, 1994; KRAUS *et al.*, 2005). O conhecimento do seu teor e função dos componentes químicos torna-se imprescindível, pois sua qualidade está relacionada à avaliação das características quantitativas e qualitativas (GONZALEZ, 1984; IBRAHIM *et al.*, 2001).

O ejaculado do carneiro apresenta volume relativamente pequeno, de 0,5 a 2,0 ml, aspecto leitoso, de coloração pérola ou marfim, e concentração espermática variando de dois a seis bilhões de espermatozoides/ml. A porcentagem de espermatozoides em relação à composição do plasma seminal é particularmente elevada, correspondente a cerca de 30% do volume total do sêmen em relação às demais espécies e pode ser utilizado fresco, resfriado ou

congelado nas biotecnologias da reprodução animal. É um produto obtido a partir da secreção das glândulas acessórias, principalmente das glândulas vesiculares, líquidos testiculares e epididimárias (GONÇALVES *et al.*, 2008). Apresenta funções importantes, como veículo para o transporte e ativação dos espermatozoides, além de proporcionar um meio rico de nutrientes que mantém a sobrevivência dos mesmos no trato reprodutivo feminino (SALAMON, 1990; REECE, 1996).

Nos ovinos, o plasma seminal é constituído principalmente por: ácido cítrico, frutose, glicorilfosforilcolina, sorbitol, inositol, fosfolípidios, prostaglandina (PGF) e proteínas (SALAMON, 1990). Além desses constituintes, foi detectado a presença de vesiglandina, adrenalina e noradrenalina (GORDON, 1999), antimicrobianos, imunoglobulinas do tipo IgA (HAFEZ; HAFEZ, 2004), espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes (SONG *et al.*, 2006; SHAMSI *et al.*, 2009). Dentre esses componentes, as proteínas desempenham papel crucial em todos os processos relacionados à capacidade fecundante dos espermatozoides, como possíveis marcadores da congelabilidade e fertilidade do sêmen (JOBIM *et al.*, 2003), além de atuarem de maneira complementar, contribuindo para a estabilidade da membrana e na viabilidade e motilidade espermática (MOURA *et al.*, 2010). Algumas pesquisas sugerem que a influência das proteínas seminais sobre os parâmetros de qualidade do ejaculado esteja associada também ao tipo de proteína presente, apesar da perda da integridade da membrana espermática ser um fator que contribui para o declínio da motilidade (ALMEIDA, 2006).

Os parâmetros seminais dos carneiros podem ser influenciados por vários fatores, como raça, variabilidade individual, mês e período do ano, fotoperíodo, condições alimentares e temperatura (MAIA, 2002; PACHECO *et al.*, 2009), influenciando as características dos ejaculados, acelerando ou retardando a entrada à puberdade e a maturidade sexual (EMSEN, 2005). Sua composição depois da emissão não permanece constante, varia ligeiramente e a perda de substâncias intracelulares proporciona aos espermatozoides uma permeabilidade alta promovendo uma interação entre o plasma seminal e o aparecimento de substâncias que não estavam presentes nas secreções das glândulas anexas antes do contato dos espermatozoides com esses fluidos seminais (MANN, T.; MANN, C., 1981; GONÇALVES, 2008). Muitos estudos mostram que ocorrem alterações diferenciadas na qualidade seminal, apresentando uma quantidade de defeitos espermáticos relevantes na seleção de reprodutores (PACHECO *et al.*, 2009). E que nos processos de congelamento de sêmen os componentes do plasma inibem tanto a capacitação espermática como possuem a habilidade de reverter os efeitos deletérios provocados pelo choque térmico, melhorando a viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do sêmen criopreservado (PÉREZ-PÉ *et al.*, 2001).

2.4. Criopreservação do Sêmen

Com advento dos conhecimentos na prática da Criobiologia desenvolveu-se a criopreservação, tecnologia que se baseia na preservação de células, tecidos ou embriões em temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, tendo como principal objetivo preservar a composição e viabilidade das células por tempo indefinido (PEGG, 2002).

Na criopreservação de amostras seminais é necessário que sejam submetidas à refrigeração moderada e controlada visando preservar a função espermática. E durante a congelação requer cuidados especiais, pois os espermatozoides não sobrevivem durante longos períodos, sendo necessário adicionar diluentes na tentativa de proporcionar um ambiente propício para sua sobrevivência. A princípio este sêmen deve ser avaliado e se for apto, requer um processamento adequado para garantir a capacidade fecundante dos espermatozoides durante o tempo que decorre entre a ejaculação e sua utilização para a inseminação (HOLT, 2000; AISEN, 2001).

O processo de criopreservação além de possibilitar sua utilização durante períodos relativamente longos pela refrigeração e indeterminados pela congelação, reduz riscos e custos na aquisição e transporte de reprodutores, além de criar a possibilidade de manipulação e armazenamento, favorecendo rápida difusão de material genético entre regiões distantes (LEBOEUF *et al.*, 2000; CASTELO *et al.*, 2008). Entretanto, segundo Purdy, (2006), este processo pode promover grande estresse celular, impondo aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade.

O sêmen pode ser processado para três usos básicos: fresco (*in natura*) colhido, analisado e fracionado sem adição de meios para preservar o material fecundante; *in natura* diluído, acrescidos de diluentes específicos com o objetivo de aumentar o volume proporcionando uma concentração de espermatozoides homogêneos; refrigerado, analisado e diluído com a finalidade de protegê-lo, com redução de temperatura a 5°C, além de usar como expensor do volume seminal facilitando seu fracionamento; e o congelado, com amostras conservadas e estocadas em nitrogênio líquido à temperatura de - 196°C possibilitando conservação e utilização por tempo indeterminado (AISEN, 2001; BICUDO *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2007).

2.5. Crioinjúrias

O crescimento da inseminação artificial tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento das tecnologias para a utilização de sêmen congelado, cujo uso tem sido limitado em razão

dos baixos índices de fertilidade conseguidos com a inseminação especificamente via cervical nos ovinos (MAXWELL; WATSON, 1996). Segundo Soares *et al.*, (2011) esta redução pode está atribuída a ocorrência de danos espermáticos durante os processos de congelação e descongelação, causando alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais reduzindo assim a viabilidade espermática.

Na utilização de sêmen congelado o índice de prenhez obtido é inferior quando comparado ao uso de ejaculados frescos e refrigerados (CARNEIRO *et al.*, 2007). Em estudo realizado por Luz *et al.*, (2000) observaram que a motilidade espermática pós-descongelação estava relacionada com esses índices e quando inferior a 40% apresentava uma redução de 15% no percentual de ovelhas prenhes. Foram constatados também alguns efeitos mais contundentes, impostos pela congelação, caracterizados por modificações da atividade respiratória, da interação com as células do oviduto, criocapacitação, além de suspeitar-se de pequeno incremento nas taxas de mortalidade de embriões obtidos com espermatozoides criopreservados (BICUDO *et al.*, 2005).

Os princípios e técnicas a serem utilizadas na criopreservação do sêmen ovino se equivalem aos dos demais ruminantes domésticos. Cada espécie possui composição seminal distinta, havendo ainda peculiaridades quanto à composição e sensibilidade das membranas espermáticas, o que explica respostas diversificadas ao processo de criopreservação do sêmen de um mesmo reprodutor. Sendo necessárias algumas modificações no atendimento a estas particularidades (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; BICUDO *et al.*, 2005; PETRUNKINA, 2007).

Dentre as alterações ocorridas na célula espermática de mamíferos submetida à refrigeração rápida da temperatura corpórea a temperaturas próximas de 5°C, destacam o choque térmico, resultando no decréscimo irreversível da motilidade espermática, alterações bioquímicas e fisiológicas (WATSON, 2000). O “efeito solução” caracterizado pela desidratação excessiva da célula, a elevada concentração de solutos, a modificação do pH e consequente alteração na função espermática também são pontos críticos do sêmen criopreservado (FAHY, 1980). No processo de congelação lenta ocorre uma migração rápida de grande quantidade de água intracelular para o meio extracelular da célula espermática estabelecendo equilíbrio entre solvente e soluto. Assim, torna-se necessário uma descongelação de igual intensidade, para que a célula ao ser reidratada não sofra rompimento das membranas biológicas devido à rápida reconstituição do volume intracelular. Por isso, quando associado à congelação rápida implica em danos causados pela formação de pequenos

cristais de gelo, agrupando grandes formações causando rompimento da membrana (WATSON, 2000).

Segundo Kumar *et al.*, (2003) o controle na redução da temperatura diminui a possibilidade de perda da viabilidade celular, devido à diminuição na formação de grandes cristais de gelo no interior da célula. É importante salientar também que a curva ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem e rápida o bastante para evitar que as células fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

A membrana plasmática dos espermatozoides foi descrita por Ladha, (1998) como uma estrutura rica em fosfolipídios, formando uma bicamada, de fosfatidilcolina e esfingomiéline externamente e fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina internamente, apresentando durante a criopreservação modificações, como a externalização da fosfatidilserina para se adequar a temperatura. Semelhante à capacitação, a criopreservação provoca na membrana espermática, maior fluidez e exposição de sítios de ligação a moléculas externas requerendo menor tempo para que a célula se capacite (THOMAS *et al.*, 2006).

Em tempos remotos Jones e Mann (1977) detectaram que o espermatozoide ovino é altamente sensível à peroxidação dos fosfolipídios presentes na membrana, ocasionando alterações estruturais, principalmente no acrossoma, com modificações no metabolismo e conteúdo intracelular além da diminuição da motilidade. No carneiro foram verificados alguns aspectos da criopreservação, que promovem na membrana espermática uma maturação excessiva e aumenta precocemente a proporção de espermatozoides capacitados e acrossomas reagidos (HOLT, 2000). Também são observados efeitos tóxicos, resultantes da oxidação de componentes celulares mediados por espécies reativas de oxigênio (ROS) que reagem com os ácidos graxos poli-insaturados e lipoproteínas da membrana celular espermática promovendo a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, podendo ser avaliado e utilizado como indicador de estresse oxidativo celular (WILLIAMS; FORD, 2005).

Na tentativa de reduzir danos causados às células espermáticas na criopreservação, são utilizadas substâncias que funcionam como crioprotetores durante a congelação do sêmen nas diversas espécies, para evitar a formação de cristais de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água e assim servir de tampão para ajustar possíveis alterações do pH (MEDEIROS *et al.*, 2002). Dentre os crioprotetores podemos citar os não penetrantes, como os açúcares complexos, lipoproteínas da gema do ovo, água de coco, proteínas do leite e alguns aminoácidos, o

glicerol, etileno glicol, DMSO e outros, atuando por meio de efeito osmótico, induzindo a saída de água intracelular (ALVARENGA *et al.*, 2005; FICKEL *et al.*, 2007).

Quanto à criopreservação de sêmen de carneiros e bovinos usando gema de ovo, observou-se que a fração LDF contida nesta substância fornece proteção às células espermáticas. Entretanto, sua utilização ainda é questionada quanto sua origem, pois pode veicular microrganismos (FARSTAD, 2009). Em estudo realizado por Valente *et al.*, (2010) avaliou sua substituição parcial e total, juntamente com a adição de trealose e glicina associada à substituição da glicose pela frutose. Mas não foi capaz de compensar sua ausência e observaram melhores resultados sobre a motilidade, termorresistência, fertilidade *in vitro* e *in vivo* pós-descongelamento após usá-la como meio diluidor nestas espécies.

O glicerol ou propano-1,2,3-triol apesar de ser um crioprotetor, em concentrações elevadas pode causar efeitos tóxicos à célula espermática, determinando desnaturação, alterações nas interações da actina na fibra da cauda do espermatozoide, no glicocálice e nas proteínas da superfície celular, podendo interferir no reconhecimento dos receptores da zona pelúcida (ALVARENGA *et al.*, 2000). Estudos revelaram a necessidade de concentrações menores às usuais de glicerol (5-7%) para a obtenção de melhores índices de criopreservação do sêmen ovino, pois em elevada quantidade determina efeito tóxico sobre os espermatozoides (MORAES *et al.*, 1998; BITTENCOURT *et al.*, 2004).

A criopreservação de sêmen pode apresentar diversas alterações na célula espermática quanto ao seu processo e uso de crioprotetores. Assim a padronização de protocolos se faz necessária na tentativa de se adequar aos parâmetros fisiológicos de cada espécie animal na tentativa de diminuir ou minimizar os efeitos deletérios da criopreservação (SILVA; GUERRA, 2011).

2.6. Avaliações Espermáticas

A qualidade do sêmen é um fator determinante para se obter bons resultados com a utilização de biotecnologias reprodutivas. Técnicas avaliativas que melhor predigam a fertilidade *in vitro* dos espermatozoides têm sido buscadas incessantemente a fim de garantir melhores resultados após a inseminação artificial. Entretanto, até o momento, nenhuma metodologia de avaliação mostrou-se eficiente para este fim quando utilizada isoladamente, sendo recomendado o emprego conjunto destas técnicas para a melhor predição da capacidade fertilizante dos espermatozoides (SILVA; GUERRA, 2011).

Dessa maneira, o exame morfofisiológico espermático faz parte da avaliação qualitativa do ejaculado e permite a determinação da frequência de cada uma das anormalidades e do percentual total na amostra seminal. É utilizado como indicativo do potencial fecundante do ejaculado, pois as alterações interferem na capacidade de movimentação e fecundação do espermatozoide, de acordo com a localização do defeito, funcionando como uma ferramenta fundamental para o descarte do ejaculado e até mesmo do reprodutor (BORTOLOZZO, *et al.*, 2005).

As características da cinética e morfologia espermáticas dos ovinos são semelhantes aos demais ruminantes e nas aplicações biotecnológicas o sêmen é facilmente obtido por meio de vagina artificial, sendo o mais comumente utilizado por ser o mais próximo do fisiológico, não requerendo muitas vezes o condicionamento prévio dos reprodutores, associado ao exame andrológico, com avaliação quantitativa e qualitativa na determinação do desempenho reprodutivo (BICUDO *et al.*, 2005).

2.6.1. Estruturas Espermáticas

O espermatozoide (Fig.2) é caracterizado como uma célula com motilidade ativa, constituído de cabeça, que tem a função de armazenamento do material genético, contendo um núcleo haploide, achatada e oval, com cromatina altamente condensada, recoberto pelo acrossoma, originado pelo complexo de Golgi durante os últimos estágios da formação do espermatozoide, correspondente a uma membrana dupla contendo em seu interior glicoproteínas e enzimas lisossômicas, como a hialuronidase, glicosidase, esterase e protease, essenciais à penetração no ovócito durante a fecundação, dividida em três regiões: a apical, intermediária e equatorial (HAFEZ; HAFEZ, 2004; GONÇALVES, *et al.*, 2008). Possui ainda a membrana plasmática que tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares, por servir de barreira seletiva. É constituída por uma bicamada de lipídios com proteínas associadas, sendo o colesterol o principal envolvido na regulação da estabilidade e permeabilidade (COOPER, 1996).

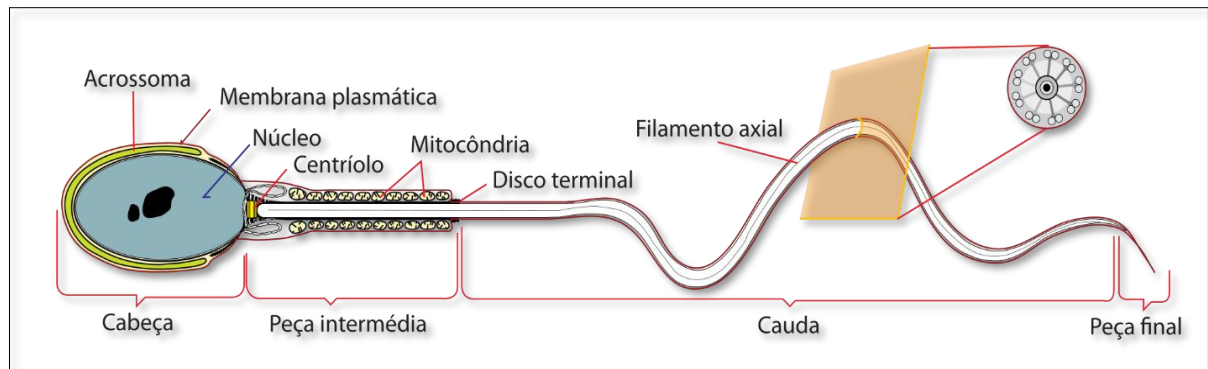
Estas membranas são importantes e devem permanecer íntegras, pois estão envolvidas nos processos de capacitação, reação acrossômica, hiperativação da motilidade e interação com a membrana plasmática do oócito (GADELLA *et al.*, 2001).

A peça intermediária é composta por mitocôndrias que circundam a região proximal do flagelo, envolvida pela bainha mitocondrial, com a função de gerar energia necessária para a motilidade espermática (BARBOSA *et al.*, 1998). A produção de ATP via glicólise pelas

mitocôndrias, é fonte energética necessária para diversos eventos reprodutivos, tais como, batimentos flagelares, hiperativação e penetração oocitária (SILVA; GADELLA, 2006).

A cauda do espermatozoide ou flagelo é recoberta por uma membrana citoplasmática comum, o plasmalema, constituído pelo axonema ou filamento axial, com função locomotora, sendo um filamento protoplasmático longo e móvel, formada pelo colo, peça intermediária, principal e terminal (DE JONG; BARRATT, 2006).

Figura 2. Desenho esquemático das estruturas do espermatozoide e suas divisões.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Espermatozoide>.

O colo corresponde a uma região de ligação da cabeça com a peça intermediária, englobando o centríolo e a gota citoplasmática. A peça intermediária é constituída por microtúbulos centrais duplos envolvidos por uma bainha mitocondrial permitindo fornecimento de energia necessária para a propulsão do espermatozoide, a peça principal é recoberta por bainha fibrosa, contem adenosina trifosfato (ATP) e pares de microtúbulos contráteis permitindo o movimento flagelar alimentado pela ação de proteínas motoras (dineínas) (GONÇALVES, *et al.*, 2008).

2.6.2. Preparação Úmida/Contraste de Fase

A morfologia espermática corresponde à avaliação das alterações estruturais e patológicas dos espermatozoides. Realizada através de preparação úmida entre lamina e lamínula, com amostras diluídas em formol-citrato, avaliadas por microscopia de contraste de fase, com contagem de células e resultados determinados em porcentagem, classificadas de acordo com o preconizado pelo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para cada espécie.

Segundo Blom, (1973), principal referência utilizada na avaliação destas, relata que as anomalias espermáticas são classificadas em defeitos espermáticos maiores e menores. Sendo

os defeitos maiores quando em porcentagem elevadas, associados à condição patológica dos testículos ou epidídimos e devido distúrbios da espermatogênese resultando como consequência em alterações na fertilidade ou até mesmo infertilidade. Os defeitos menores também podem causar infertilidade, entretanto, é menos provável, havendo fertilização.

2.6.3. Provas de Integridade da Ultraestrutura Espermática

A análise *in vivo* do sêmen é uma ferramenta importante na determinação da capacidade reprodutiva do macho, complementando as informações obtidas durante a realização do exame clínico. Tal contribuição tem valor diagnóstico na avaliação da função testicular, epididimária e de todo o sistema reprodutor do macho, auxiliando na identificação de casos de subfertilidade ou infertilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Tradicionalmente, além de volume e aspecto, a análise do sêmen inclui a determinação da concentração, motilidade e morfologia espermática, rotineiramente realizada por microscopia de luz convencional. As limitações destes métodos incluem subjetividade, variabilidade, o reduzido número de espermatozoides analisados e a pobre correlação com o potencial fertilizante destes gametas (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN *et al.*, 2002; CELEGHINI, 2005).

Nos últimos anos diversas técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas com o intuito de demonstrar maior repetibilidade na avaliação da morfologia e função espermática. Dentre elas, podemos destacar os sistemas computadorizados com análise de imagens, métodos de coloração empregando sondas fluorescentes e microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, com análises mais criteriosas e objetivas sobre a integridade estrutural dos espermatozoides (MATOS *et al.*, 2008; ARRUDA *et al.*, 2011).

As sondas fluorescentes ou fluorocromos são utilizadas isoladamente ou em combinação para determinar a integridade da função celular, como a integridade da membrana, do acrossoma e potencial mitocondrial. Embora seu uso por meio de microscopia seja um método para avaliação espermática, o número de espermatozoides normalmente examinados por análise não excede a 200 células. Já a citometria de fluxo é bem mais vantajosa, pois consiste em um sistema automatizado que tem a capacidade de examinar em torno de 30.000 espermatozoides em um minuto, permitindo exatidão nos resultados e diminuição na sua execução quando comparada com outras técnicas fluorescentes (ARRUDA, 2000).

2.6.4. Avaliação da Cinética Espermática

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido à relevância da cinética na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Diversos sistemas têm sido propostos na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo andrológico humano e animal (VESTEGEN *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2008).

O *Computer Assisted Sperm Analyses* (CASA) é um hardware e software que visualiza e digitaliza imagens sucessivas de espermatozoides, processa e analisa informações acuradas, precisas e significativas sobre a cinética individual das células espermáticas e valores estatísticos de um total da amostra. Os espermatozoides móveis observados são identificados sucessivamente em imagens que permitem a definição de trajetórias de forma numérica e os resultados são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide (AMANN; KATZ, 2004).

Os parâmetros avaliados são: motilidade total (%), proporcional às células móveis do total; motilidade progressiva (%), referente à porcentagem de células movendo-se progressivamente; velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) velocidade média em linha reta entre o ponto inicial e final do trajeto; velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média de ponto a ponto percorrido; amplitude do deslocamento lateral da cabeça (AHL, $\mu\text{m/s}$) largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; frequência de batimentos (BCF, $\mu\text{m/s}$) frequência com que a cabeça se move para trás e para frente durante o trajeto percorrido; retilinearidade (STR,%) valor médio da proporção entre VSL/VAP; linearidade (LIN, %), valor médio da proporção entre VSL/VCL; velocidade rápida (%) (ARRUDA, 2000).

As características do movimento espermático ainda não estão bem determinadas pelo sistema CASA sobre qual dos parâmetros é capaz de prever a fertilidade e a taxa de fertilização. No entanto algumas variáveis geradas como a linearidade espermática parecem apresentar maior correlação com fertilidade (FERREIRA *et al.*, 1997).

O grande desafio para executar este sistema automatizado é padronizar os procedimentos laboratoriais adotados para a análise objetiva do sêmen, manter a concentração espermática, os diluidores e substâncias que não interfiram nas avaliações causando diminuição da motilidade, pois quando apresenta partículas no meio o sistema reconhece como células imóveis (ARRUDA, 2011).

2.7. Hormônio do Crescimento (GH)

O hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina (ST) é um polipeptídeo com 191 resíduos, com peso molecular de 21000 KDa, obtido artificialmente pela abordagem do DNA recombinante originando a somatotropina bovina recombinante (rbST) exógena (LEHNINGER, 1991).

Hormônio pituitário, anabólico, secretado pelas células acidófilas do lobo anterior da hipófise, apresentando uma variedade de receptores mRNA da somatotropina, encontrados no hipotálamo, hipófise, corpos lúteo, folículos ovarianos, ovidutos, endométrio, miométrio, placenta (KIRBY *et al.*, 1996), testículos, vasos deferentes, próstata, epidídimo e vesículas seminais (LOBIE *et al.*, 1990), que diminui a deposição de gordura, em virtude do aumento e deposição de proteína, regulando inúmeros mecanismos do crescimento animal, metabolismo de nutrientes além de afetar as funções reprodutivas (PIVATO *et al.*, 2004). Também importante na diferenciação e maturação sexual, puberdade, esteroidogênese e gametogênese (HULL; HARVEY, 2000).

Sua secreção é pulsátil e pode ser influenciada por vários sistemas de retroalimentação de complexidade peculiar, dentre eles a glicose, ácidos graxos, somatostatina, fatores de crescimento e outros, como mostra a (AMORIM *et al.*, 2007).

Em revisão bibliográfica contemplando estudos sobre o GH, realizada por HULL e HARVEY, (2000), revelam que tem função na regulação da esteroidogênese, gametogênese e a diferenciação gonadal, como resposta a secreção de gonadotrofinas, com ações locais que podem refletir em funções endócrinas, autócrinas ou parácrinas nos tecidos reprodutivos. Sua concentração em níveis adequados na maturação sexual em mamíferos é extremamente necessária. Deficiências em roedores estão associadas com puberdade tardia, redução no tamanho dos testículos, espermatogênese e na capacidade de resposta dos hormônios FSH e LH.

A utilização do GH em machos iniciou-se em humanos que apresentavam puberdade tardia associada à sua deficiência, condição esta para o tratamento ser normalizado (BREIER *et al.*, 1998). Muitos estudos, incluindo a espécie humana e roedores foram conduzidos relacionando infertilidade reprodutiva com deficiência deste hormônio, demonstrado efeito satisfatório após tratamento com rbST (MARTIN *et al.*, 1997). Em bovinos tratados com este hormônio, demonstraram que há um aumento na quantidade de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra, sugerindo alterações positivas na elevação nas taxas de

fertilização, mostrando assim seu efeito benéfico (DUARTE *et al.* (2006). Matsushima *et al.*, (1986) observaram uma quantidade reduzida de espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides em roedores com deficiência de GH, sendo responsável pela diminuição da espermatogênese. Em algumas espécies pode acelerar a puberdade por potencializar a ação androgênica, com a ação da testosterona influenciando nas características secundárias, e induzir a espermatogênese, com aumento de volume testicular, provavelmente devido aumento na diferenciação celular das células de Leydig e Sertoli. Determinados peixes da raça Dourado e em Trutas apresentam substancialmente aumento dos níveis de GH nos estágios finais do ciclo reprodutivo da espermatogênese (SUMPTER *et al.*, 1991; MARCHANT; PETER, 1986). Polimorfismos do gene de GH em touros também foram correlacionados com a produção de espermatozoides, com aumento da concentração, motilidade, desempenhando assim um importante papel na espermatogênese e espermiogênese (LECHNIAK *et al.*, 1999).

Seu uso pode melhorar as taxas de fertilização, por agir sobre as características dos espermatozoides, além de favorecer seu metabolismo. Foi demonstrado que a Somatotropina (ST) participa no controle da espermatogênese e esteroidogênese, tendo as células de Sertoli, como uma das maiores fontes testiculares de IGF-I (RITZEN, 1983), com receptores também para IGF-I detectados nas células de Leydig como demonstra na figura 3 (LIN *et al.*, 1986).

O tratamento com somatotropina exógena aumenta a concentração plasmática do fator de crescimento semelhante a Insulina (IGF-I) que é o principal mediador da ação deste hormônio, sendo um importante agente mitogênico para o desenvolvimento das células germinativas e manutenção dos espermatozoides (DUARTE *et al.*, 2006).

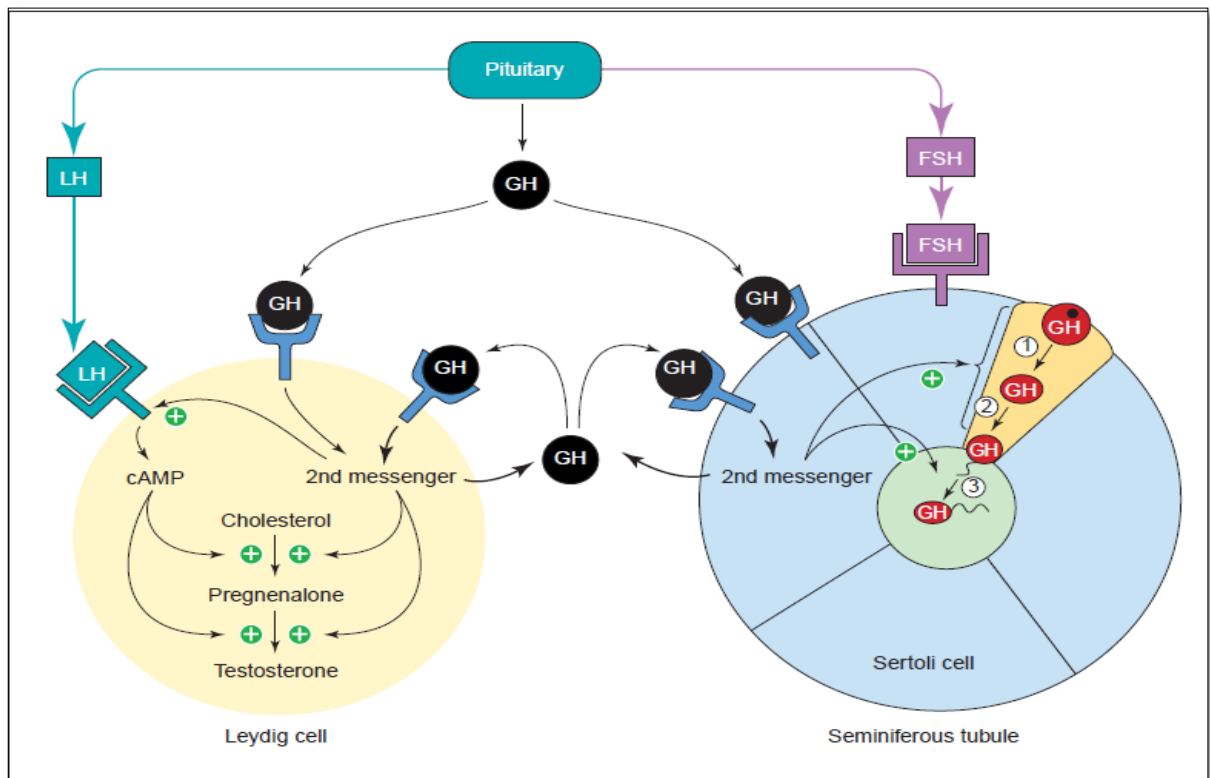
2.8. Somatotropina Bovina Recombinante (rbST)

A somatotropina bovina foi descoberta em 1920 por Evans e Simpson e somente na década de 80 a partir de inúmeras pesquisas ocorreu a sua produção em escala industrial pela técnica de DNA recombinante em *Escherichia coli* (SPINOSA *et al.*, 2006).

O rbST possui mecanismos biológicos que são classificados como somatogênicos, ou seja, aqueles que estimulam a proliferação celular, mediados por IGF-I produzidos pelo fígado, com ação indireta sobre os tecidos mamários. Classificados como metabólicos os que se referem à sua ação direta sobre vários tecidos e, em especial sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (NETO *et al.*, 2009).

O tratamento eleva a concentração sanguínea de GH, dose dependente, acompanhada de elevação dos níveis de IGF-I, que perdura por 4 a 8 horas, retornando a concentrações circulantes normais após esse período (EARLY *et al.*, 1990). Tem amplo aspecto comercial na bovinocultura de leite, promovendo resultados relevantes na produção da indústria leiteira, apresentando aumento na lactação de animais. Porém ainda com poucos estudos relacionados aos machos quanto às taxas metabólicas (SIROTKIN, 2004; AMORIN, 2007).

Figura 3. Mecanismo de ação do GH nos testículos.



Fonte: Hull; Harvey, 2000.

Os mecanismos através dos quais a ST desempenha o seu efeito na célula espermática e na produção de testosterona ainda são complexos, necessitando de mais pesquisas na determinação da dose e tempo de tratamento ideal para cada espécie animal. Assim, a ST pode ser uma alternativa interessante na tentativa de melhorar a qualidade espermática de espécies que apresentam menor resistência espermática aos processos de congelamento e descongelamento, como ovinos e suínos. Em bovinos, mesmo havendo uma maior resistência às alterações causadas pela criopreservação sobre a qualidade espermática, apresentou melhores parâmetros reprodutivos, com índices elevados de fertilidade (CORRÊA *et al.*, 2009).

Segundo Souza *et al.*, (2010) é possível que a expressividade de alguns elementos do plasma seminal, como proteínas e hormônios, possa servir como marcadores para sêmen de alta ou baixa fertilidade e que vários estudos têm demonstrado a associação de proteínas do plasma seminal com a fertilidade em bovinos. Alguns fatores endócrinos e ou locais, podem estar associados à expressividade e ou função destas proteínas, auxiliando nas condições espermiáticas favoráveis à fecundação. Dentre estes, destacam-se a Insulina, a leptina e o fator de crescimento semelhante à Insulina do tipo I. Desta maneira o estudo das proteínas do plasma seminal associado à condição metabólica destes hormônios presentes pode servir como parâmetro de avaliação da condição reprodutiva do macho.

As proteínas são os componentes orgânicos encontrados em maior quantidade neste meio. Contudo, o plasma seminal também apresenta sais minerais e hormônios que atuam juntamente a estas proteínas, estabelecendo importantes funções fisiológicas sobre as células espermiáticas (JELINKOVÁ *et al.*, 2003). Entre os hormônios presentes, destacam-se a leptina, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina, o IGF-I, por apresentarem papel primordial na estrutura e motilidade espermiática, favorecendo a fecundação (TENA; BARREIRO, 2002).

A insulina está presente no plasma seminal e pode envolver-se em eventos na capacitação e metabolismo autócrino do espermatozoide (AQUILA *et al.*, 2005). Quando adicionada em diluente na criopreservação aumenta a motilidade, a cinemática e integridade de acrossoma do sêmen ovino TILBURG *et al.*, (2008). É um hormônio anabólico que promove a captação de glicose e aminoácidos, a síntese de proteínas e lipídeos e o aumento das funções intracelulares e de membrana plasmática (ABDELMONEIN *et al.*, 1998). A insulina e o IGF-I são hormônios polipeptídios essenciais para o metabolismo normal e a regulação do crescimento, mediante ligação com seus respectivos receptores transmembranares na superfície da célula-alvo (DUPONT *et al.*, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado os relevantes efeitos, como em equinos, onde a motilidade espermiática total e taxas de prenhez tendem a serem superiores, apresentando elevada concentração de IGF-I no plasma seminal (MACPHERSON *et al.*, 2002). Além de trabalhos *in vitro* com melhora significativa da motilidade total progressiva de espermatozoides bovinos (HENRICKS *et al.*, 1998).

Segundo Albedelmonein *et al.*, 1998 a insulina por estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática pode melhorar as taxas de sobrevivência após o ciclo de congelamento e descongelamento. E quando adicionada no diluente de congelamento não demonstra citotoxicidade para

espermatozoides ovinos, com resultados promissores na qualidade espermática. Entretanto, necessitando de mais estudos que evidenciem qual mecanismo metabólico atua e qual a sua correlação com a fertilidade (TILBURG *et al.*, 2010).

CAPÍTULO I*

“Características do sêmen fresco e biometria escrototesticular de ovinos Santa Inês tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST)”

CAPÍTULO II*

“Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) no sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês”

CAPÍTULO I *

“Características do sêmen fresco e biometria escrototesticular de ovinos Santa Inês tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST)”

* Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. ISSN:1678-4162 (submetido)

1 **Características do sêmen fresco e biometria escrototesticular de ovinos Santa Inês**
2 **tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST)**

3 [Characteristics of fresh semen and biometrics escrototesticular of the Santa Ines ovine
4 treated with recombinant bovine somatotropin (rbST)]

5 L. A. *Gomes*^{1*}, J. A. T de *Souza*¹

6 ¹ Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Piauí –
7 UFPI, Campus da Socopo, CEP: 64049-550, Teresina, PI, Brasil

8 * Email para correspondência: le_medvet@hotmail.com

9
10 **RESUMO**

11
12 Objetivou-se avaliar as características seminais e biometria testicular de
13 carneiros Santa Inês tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST).
14 Divididos aleatoriamente em grupos, recebendo solução placebo e duas doses de rbST,
15 na concentração de 100 e 125mg: T-I (2mL/NaCl 0,9%), T-II (100mg/rbST) e T-III
16 (125mg/rbST), via subcutânea a cada 14 dias (D0,14,28,42,56,70). Também foram
17 mensurados perímetro escrotal, comprimento, largura e volume testicular. Os ejaculados
18 colhidos por vagina artificial, com auxílio de ovelha manequim, foram analisados
19 quanto ao volume, turbilhão, motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática.
20 Não houve diferença significativa ($P>0,05$) no PE (30,1cm), volume médio dos
21 testículos ($468,15\text{cm}^3$), e nos ejaculados quanto ao volume (VOL), turbilhão (TUB),
22 vigor (VIG), defeitos maiores (DMA) e defeitos menores (DME). A motilidade (MOT)
23 do T-III apresentou-se inferior (62,2%), comparados ao T-I (76,3%) e T-II (76,9%); os
24 defeitos totais (DEFT) do T-I (41,93%) foram superiores e os DMA no T-II e T-III
25 foram $< 10\%$ (8,38%; 8.97%). A concentração espermática (espermatozoide/mL) no T-
26 III foi superior e significativa (787.69 ± 480.72) comparada ao T-I (546.81 ± 252.54) e T-
27 II (679.96 ± 23.17). Concluiu-se que a aplicação de 100 e 125mg/rbST em ovinos Santa
28 Inês não altera as medidas escrototesticulares e as características seminais. A dose de
29 125mg/rbST aumenta a concentração espermática.

30
31 **Palavras-chave:** testículos, biometria, ovinos, somatotropina, sêmen.

32
33

34

ABSTRACT

35 This study aimed to evaluate the seminal characteristics and scrotal circumference of
36 sheep Santa Inês treated with recombinant bovine somatotropin (rbST). Randomized
37 into groups receiving placebo solution and two doses of rbST at a concentration of 100
38 and 125mg: T-I (2 mL / 0.9% NaCl), T-II (100mg / rbST) and T-III (125mg / rbST)
39 subcutaneously every 14 days (D0, 14, 28, 42, 56, 70). They were also measured scrotal
40 circumference, length, width and testicular volume. The ejaculates collected by artificial
41 vagina with the aid of dummy sheep were analyzed for volume, whirl, motility, vigor,
42 morphology and sperm concentration. There was no significant difference ($P > 0.05$) in
43 PE (30,1cm), testis volume (468,15cm³), and ejaculated on the volume (VOL), vortex
44 (TUB), vigor (VIG), defects higher (DMA) and smaller defects (DME). The motility
45 (MOT) showed T-III is lower (62.2%), compared to T-I (76.3%) and T-II (76.9%); the
46 total defects (DEFT) T-I (41.93%) were higher and the DMA in the T-II and T-III were
47 $< 10\%$ (8.38%; 8.97%). The sperm concentration (sperm / mL) in the T-III was greater
48 and significant (787.69 ± 480.72) compared to T-I (546.81 ± 252.54) and T-II ($679.96 \pm$
49 $23:17$). It was concluded that the application of 100 and 125mg / rbST in Santa Ines
50 sheep does not change the escrototesticulares measures and seminal characteristics. The
51 dose of 125mg / rbST increases sperm concentration.

52

53 Keywords: testis, biometrics, sheep, somatotropin, semen.

54

55

INTRODUÇÃO

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

O (GH) ou hormônio do crescimento, também conhecido por somatotropina (ST) é um polipeptídeo, anabólico, secretado pelas células acidófilas da adenohipófise, que regula inúmeros mecanismos do crescimento animal, metabolismo dos nutrientes, além de afetar as funções reprodutivas (Hull e Harvey, 2000). Vários estudos foram fundamentais no esclarecimento da importância da somatotropina bovina recombinante (rbST) e no conhecimento do seu mecanismo de ação como um bioquímico mediador e regulador de funções variadas dentre as espécies. Entretanto, existem alguns resultados ainda conflituosos em relação a sua modulação no metabolismo, sistema endócrino e nos tecidos alvo.

66 O tratamento de animais com este hormônio induz a um incremento na
67 produção de IGF-I, principal mediador da ação da ST, aumentando a proliferação
68 celular a nível testicular e consequente produção espermática, caracterizando-se como
69 um importante agente mitogênico no desenvolvimento das células germinativas e
70 manutenção dos espermatozoides, com reflexo sobre toda a vida reprodutiva do macho
71 (Duarte *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2009), apresentando efeitos positivos na qualidade do
72 sêmen em algumas espécies, como verificado em bovinos e suínos, entretanto, necessita
73 de mais estudos que demonstrem dados minuciosos e contundentes, especialmente em
74 pequenos ruminantes. Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a
75 biometria escrototesticular e as características do sêmen fresco de ovinos da raça Santa
76 Inês sobre efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST).

77

78

MATERIAL E MÉTODOS

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI (nº006/14) e desenvolvida no período de março, abril e maio de 2014, nas instalações no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal - LBRA no Centro de Ciências Agrárias, Campus da Socopo da referida instituição, em Teresina-PI, pertencente à região meio norte do Piauí, com latitude de 5°5'20 Sul e longitude de 42°48'07 Oeste, altitude de 72m e clima tropical úmido com temperatura mínima de 20°C e máxima 35°C.

Foram utilizados 18 carneiros Santa Inês, com idade entre 22 a 36 meses, com escore corporal entre 3 e 4 e peso vivo (PV) variando de 28,5 a 61,5 Kg durante o experimento. Todos os animais foram acompanhados diariamente, vermifugados e vacinados, submetidos ao exame andrológico e ultrassonografia dos testículos e glândulas sexuais anexas para diagnóstico precoce de possíveis alterações patológicas. Manejados em regime semi-intensivo e alimentados duas vezes ao dia com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) triturado, oferecido no cocho, suplementados com ração comercial na proporção de 3% do PV, composta por farelo de trigo, soja, arroz, milho integral moído, óleo vegetal degomado, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum) e premix mineral vitamínico, 500g de concentrado/dia/animal, contendo 17% de proteína bruta, 9% de fibra bruta, além de água e sal mineral à vontade.

98 Os animais foram divididos em três grupos aleatórios: o controle TI (n=6)
99 recebendo 2 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e os tratamentos TII (n=6)
100 100mg/rbST e TIII (n=6) 125mg/rbST (BOOSTIN[®] Intervet Schering Plough),
101 aplicados via SC a cada 14 dias de acordo com Macdonald e Deaver (1993) nos dias D0,
102 14, 28, 42, 56 e 70. A cada aplicação foi realizado a biometria escrototesticular,
103 avaliando a consistência dos testículos e epidídimos, tracionando os testículos direito e
104 esquerdo simetricamente, mensurado o PE (cm) com fita métrica andrológica na região
105 mediana do escroto e com paquímetro o comprimento e largura dos testículos. O
106 volume testicular (cm³) foi calculado pela “fórmula do cilindro” $VOL = 2 [(r^2) \times \pi] \times$
107 $h]$, sendo o raio ($r = largura\ testicular/2$), $\pi = 3,14$ e $h = comprimento\ ou\ altura$
108 $testicular$, onde obtemos a forma testicular (cm) pela razão entre a largura e o
109 comprimento testicular (Fileds *et al.*, 1979).

110 As coletas de sêmen dos carneiros foram realizadas a cada 14 dias, por método de
111 vagina artificial (VA) com auxílio de uma ovelha manequim, após prévia limpeza do
112 prepúcio. O comportamento sexual (libido) foi caracterizado pelo interesse do macho à
113 fêmea, cronometrando-se o tempo (s) do cortejo ao salto ejaculatório. As coletas foram
114 conduzidas em horário pré-estabelecido entre sete e nove horas da manhã, para não
115 comprometer o desempenho dos animais e a qualidade do sêmen, bem como o bem
116 estar, visando amenizar a influência dos fatores climáticos, devido às elevadas
117 temperaturas, comumente observadas no período da tarde. Após a obtenção do
118 ejaculado, foi submetido à avaliação macroscópica quanto ao aspecto, cor, odor, volume
119 (mL), e por microscopia óptica quanto à motilidade total (0-100%), vigor (0-5) e
120 turbilhão (0-5), sendo uma alíquota de 20µL do sêmen diluído em formol salino (1: 200)
121 para avaliação da concentração e morfologia espermática em microscópio de contraste
122 de fase (Olympus, Japão), utilizando aumento de 200x (CBRA, 2013). A concentração
123 espermática foi avaliada por meio da técnica de Câmara de *Neubauer*, expresso em
124 número de espermatozoides/mL. Para análise morfológica foi utilizado técnica de
125 câmara úmida contando 200 células e os defeitos classificados em totais, maiores e
126 menores de acordo com Blom (1973).

127 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema
128 fatorial 3x6, três tratamentos por seis animais e seis coletas pré-determinadas, utilizando
129 o MIXED do software Statistical Analysis System (SAS, 2015). As médias foram

130 estimadas por quadrados mínimos das variáveis estudadas comparadas pelo teste t e de
 131 Tukey-Kramer para dados não balanceados, teste de Tukey em níveis de 5% de
 132 probabilidade.

133

134

RESULTADOS E DISCUSSÃO

135

136

137

138

139

140

141

Ao exame clínico geral e quanto à integridade dos órgãos reprodutivos dos animais não foi detectado por inspeção, palpação e pelo exame ultrassonográfico, lesões quanto à consistência testicular, edema, processos inflamatórios, nodulações, ectoparasitas, dermatoses, sensibilidades dolorosas e malformações congênitas ou adquiridas que comprometessem o desempenho reprodutivo destes durante o protocolo experimental.

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

Na biometria escrototesticular realizada semanalmente a cada administração dos tratamentos e coletas de sêmen, não foi verificado diferença estatística (Tabela 1) quanto ao perímetro escrotal (PE) e volume testicular direito (VTD) e esquerdo entre os animais, demonstrando a princípio que não houve um efeito significativo do rbST em nenhuma das doses analisadas sobre as células teciduais testiculares dos ovinos em estudo que promovessem um aumento de tamanho. Entretanto apresentaram médias dentro do esperado para carneiros púberes, segundo manual do CBRA (2013) que estabelece como padrão um PE de no mínimo 30 cm. A média do volume testicular foi de 468,15cm³, superior aos encontrados por Souza *et al.*, (2007) e Bartholazzi Junior *et al.*, (2014) que trabalharam com a mesma faixa etária.

152

153

154

Tabela 1. Perímetro escrotal e volume testicular esquerdo e direito ($\bar{x} \pm dp$) de ovinos Santa Inês tratados ou não com rbST.

Parâmetros	Tratamentos		
	T-I (Controle) (n=6)	T-II (100mg/rbST) (n=6)	T-III (125mg/rbST) (n=6)
PE (cm)	30,14 ^a ± 1,03	30,04 ^a ± 1,40	30,21 ^a ± 0,92
VTD (cm ³)	216,49 ^a ± 50,28	226,55 ^a ± 44,82	233,24 ^a ± 36,60
VTE (cm ³)	234,32 ^a ± 48,40	230,43 ^a ± 48,13	263,42 ^a ± 29,07

155

156

157

158

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey (P>0,05).
 Perímetro Escrotal (PE); Volume Testicular Direito (VTE); Volume Testicular Direito (VTD).

159 Souza *et al.*, (2001) acompanhando parâmetros reprodutivos de ovinos da raça
160 Santa Inês, com 42 semanas de idade e peso médio de 52,50kg, criados no Estado do
161 Ceará, em pastagem irrigada, recebendo suplementação diária de concentrado
162 verificaram perímetro escrotal de 31,13cm, semelhante à média (31,91±2,33cm) obtida
163 por Souza *et al.* (2007). Também foram encontrados valores de 29,45 a 34 cm
164 (Carvalho *et al.*, 2002), corroborando com a média (30,1cm) dos grupos deste estudo. É
165 importante salientar que nesta pesquisa foram realizadas mensurações biométricas para
166 avaliar os animais quanto ao efeito do rbST, desconsiderando-se a influência da época
167 do ano, fator que age como importante fonte de variação nesta característica.

168 Estudos realizados por Corrêa *et al.* (2009) mostraram que o rbST atua
169 aumentando os níveis do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I),
170 causando proliferação tecidual e consequente aumento dos testículos. Efeito semelhante
171 também foi evidenciado por Rabassa (2012) em suínos, onde a somatotropina (ST)
172 promoveu um maior desenvolvimento testicular. Porém, nos ovinos Santa Inês
173 utilizados neste experimento não se observou alterações estatísticas que pudéssemos
174 correlacionar o efeito deste hormônio com o perímetro escrotal. Entretanto, verificou-se
175 interação entre os dias das coletas com as médias do PE obtidas do grupo T-I (controle),
176 apresentando medidas variando de 29,9 a 31,9cm no D14, 28, 56 e 70 e no D0 e 42 com
177 médias inferiores. Aos setenta dias (D70) do experimento, foram verificados valores
178 mais elevados em todos os três grupos quanto à circunferência escrotal, comparados às
179 coletas anteriores. Essa variação gradativa, possivelmente se deve ao desenvolvimento
180 natural e metabólico dos carneiros, promovendo crescimento corporal e consequente
181 aumento testicular, haja vista que eram animais púberes e de faixa etária variada.

182 A biometria testicular é amplamente difundida entre as diversas espécies,
183 fornecendo um modelo útil para melhor compreensão do mecanismo fisiológico do trato
184 reprodutivo do macho e suas correlações com a produção espermática, capacidade de
185 serviço e desenvolvimento sexual (Martins *et al.*, 2008). Entretanto, trabalhos com
186 mensurações analisando o efeito da somatotropina exógena, ainda é bastante escasso
187 referentes à espécie ovina. Segundo Moraes e Oliveira, (1992) o maior interesse por
188 essas características deve-se à possibilidade de se estimar a relação entre o tamanho
189 testicular e a função gametogênica e assim predizer o seu potencial reprodutivo. Além
190 de associar essas mensurações com idade à puberdade e desenvolvimento corporal

191 (Souza, 2003). Durante a puberdade e na fase adulta as medidas testiculares de
 192 comprimento e largura passam a se alterar no macho, pois têm sua espermatogênese
 193 acelerada como resultado de aumentos de FSH que atuam diretamente nas células de
 194 Sertoli nos túbulos seminíferos. E como a maior parte dos testículos é composta por
 195 esses túbulos, o maior desenvolvimento desta gônada reflete maior atividade de ondas
 196 espermatogênicas (Lincoln *et al.*,1990), que se repetem em intervalos regulares de 15
 197 dias, perfazendo ciclo completo de aproximadamente 49 dias em ovinos (Oliveira e
 198 Silva, 2013). O GH é caracterizado por ter um efeito anabólico, apresentando
 199 mecanismos biológicos classificados como somatogênicos que estimulam o
 200 crescimento, a proliferação celular, agindo diretamente sobre vários tecidos, dentre eles
 201 os testículos (AMORIM, *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2009).

202 No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,0$; Figura
 203 1a, 1b, e 2) sobre as mensurações do comprimento do testículo direito (CTD), largura
 204 do testículo direito (LTD), comprimento do testículo esquerdo (CTE) e largura do
 205 testículo esquerdo (LTE) entre os grupos, no entanto foi observado uma interação dos
 206 dias das coletas (Figura 3), apresentando um aumento gradativo da LTE no decorrer do
 207 D14 até o D56, independente dos tratamentos, o que há de ser esperado à medida que o
 208 animal se desenvolve e conseqüentemente ocorre o crescimento somático e testicular.

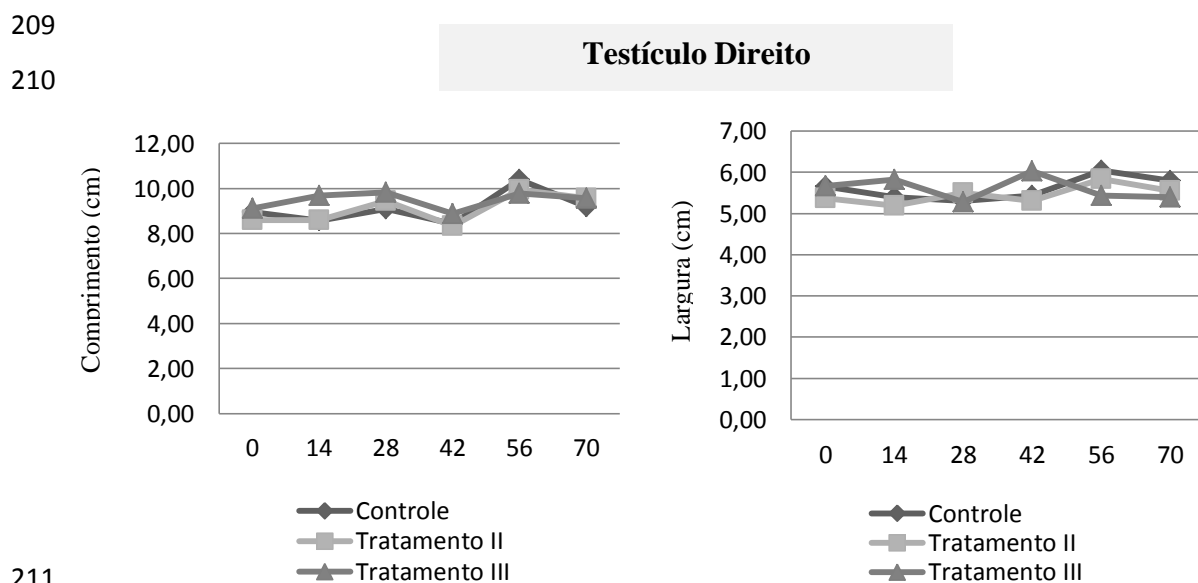
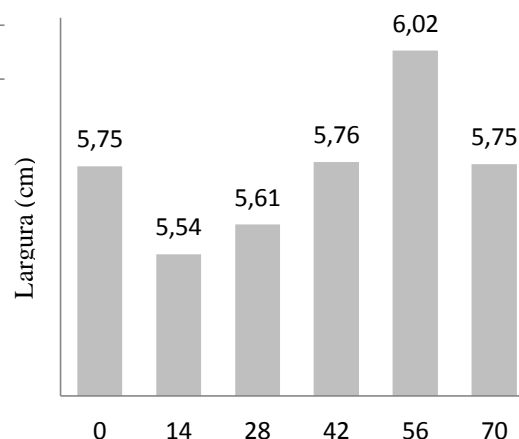
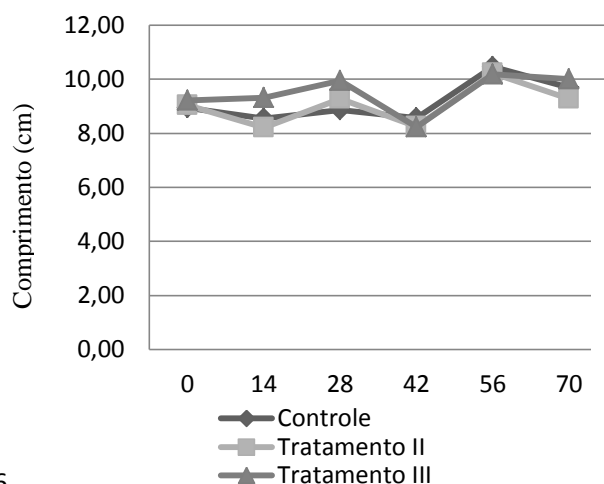


Figura 1a. Comprimento (cm) do testículo direito (CTD) de ovinos tratados ou não com rbST.

Figura 1b. Largura (cm) do testículo direito (LTD) de ovinos tratados ou não com rbST.

215

Testículo Esquerdo



216

217 Figura 2. Comprimento (cm) do testículo
218 esquerdo (CTE) de ovinos tratados ou não
com rbST.

217 Figura 3. Largura (cm) do testículo
218 esquerdo (LTE) de ovinos tratados ou não
com rbST.

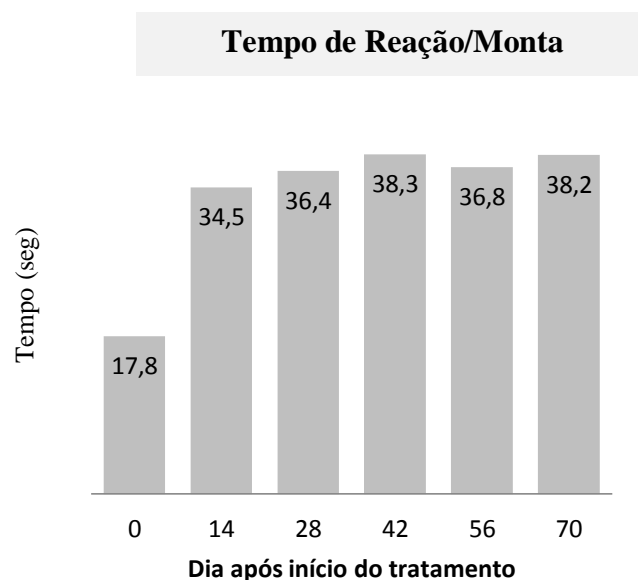
219

220 Na Figura 3 verificou-se no D70 do experimento, correspondente à última coleta,
221 que houve um declínio acentuado nas medidas da LTE (cm) apresentando médias
222 semelhantes no D0 e D42, indicando a princípio um comportamento errático das
223 mensurações, pois o esperado seria um aumento gradativo e não uma diminuição dessas
224 medidas. Outra explicação para esse efeito pode estar relacionado à espermatogênese
225 (Oliveira *et al.*, 2013). Embora os resultados não tenham apresentado alterações
226 relevantes quanto à biometria testicular referentes ao tratamento dos animais com 100 e
227 125mg/rbST, não foi verificado efeitos negativos que comprometessem o
228 desenvolvimento testicular e a qualidade do sêmen.

229 Quanto ao comportamento sexual (libido) dos animais durante as coletas de
230 sêmen foram identificados: procura pela fêmea, cheiradas, cabeçadas, o ato de raspar o
231 chão ou tocar o posterior da fêmea com um dos membros, lambidas, reflexo de
232 *Flehmen*, gotejamento de plasma seminal, movimentos pélvicos, monta e ejaculação,
233 características semelhantes às descritas por Oliveira *et al.*, (2013). O tempo de cortejo e
234 salto ejaculatório não apresentou diferença significativa entre os grupos. Entretanto
235 todos os animais manifestaram bom desempenho sexual, realizando a monta completa
236 em tempo médio e uniformizado de 35,5 segundos nos dias (14, 28, 42, 56 e 70), e no
237 D0 apresentou um menor tempo 17,8 segundos (Figura 4).

238

239
240



241
242
243

Figura 4. Tempo de cortejo e monta completa dos ovinos Santa Inês tratados e não tratados com rbST nos dias de coletas D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

244 Em estudos com carneiros Santa Inês realizado por Souza *et al.*, (2001);
245 Rodrigues *et al.* (2005) e Souza *et al.* (2007) obtiveram tempo de reação inferior a dois
246 minutos, refletindo uma boa avidez sexual dos animais. Nas pesquisas utilizando
247 somatotropina exógena, em touros Sahiwal tratados com 500mg/rbST foi observado um
248 menor tempo de reação, com aumento da libido e testosterona (Dilbar *et al.*, 2014). Em
249 touros Friesian foram encontrados resultados semelhantes. Outrora, em búfalos o tempo
250 de reação não foi significativa, haja vista a influência dos efeitos sazonais (Abd El-Aziz
251 *et al.*, 2009). Segundo Hafez e Hafez (2006) está bem estabelecida que a libido esteja
252 correlacionada aos andrógenos, principalmente a testosterona. O que provavelmente
253 pode ter influenciado nos resultados obtidos, porém não podemos afirmar, uma vez que
254 não foram dosados os níveis séricos de testosterona. Não foi observado também
255 correlação do perímetro escrotal dos carneiros com o tempo de reação (libido).

256 Os volumes seminais se mostraram adequados para a espécie ovina e ligeiramente
257 superiores nos grupos tratados com rbST. Segundo Gonçalves *et al.*, (2008), o ejaculado
258 do carneiro pode apresentar volume em torno de um a dois mililitros perfazendo um
259 total de espermatozoides variando entre dois e seis bilhões, com alta motilidade (80%)
260 ou mais de células, e movimento retilíneo progressivo. Em experimento utilizando
261 bovinos tratados com 500mg/rbST, obteve-se um aumento do volume de sêmen (Hafez
262 *et al.*, 2005). Também observado por Shakweer *et al.*, (2001) quando avaliou as

263 características bioquímicas do sêmen de carneiros egípcios da raça Rahmani, após
 264 aplicação de 100mg/rbST, apresentando um volume de (1,18±0,07) comparado ao
 265 grupo controle (1,00±0,04). O VOL, TURB e VIG (Tabela 2) não variaram
 266 significativamente ($p>0,05$) nos grupos entre si, porem observa-se no grupo T-III um
 267 maior volume, associado a uma diminuição do turbilhão e vigor, comparado ao T-I e T-
 268 II, influenciando também na motilidade progressiva. Embora a maioria das variáveis
 269 tenham apresentado valores adequados para a espécie, a MOT dos animais tratados com
 270 125mg/rbST (T-III) foi inferior ($p<0,05$; Tabela.2) e as porcentagens de DEFT foram
 271 superiores à recomendada pelo CBRA (2013), que é $>70\%$ e $<20\%$ respectivamente.
 272 Houve um maior déficit na motilidade nas coletas do D42 para todos os grupos. Esta
 273 interação em relação ao grupo e dia da coleta, apresentando diminuição da MOT pode
 274 ser decorrente há diversos fatores, dentre eles ao percentual de patologias. Segundo
 275 Bearden *et al.*, (2004), quanto maior for a porcentagem de espermatozoides anormais
 276 menor será a motilidade.

277

278 Tabela 2. Características físicas e morfológicas do sêmen fresco de ovinos Santa Inês
 279 tratados ou não com rbST.

Parâmetros	Tratamentos			
	CV %	T-I (Controle) (n=6)	T-II (100mg/rbST) (n=6)	T-III (125mg/rbST) (n=6)
VOL (mL)	-	0,88 ^a	0,93 ^a	1,01 ^a
TURB (0-5)	-	3,37 ^a	3,42 ^a	3,03 ^a
MOT (%)	-	76,3 ^a	76,9 ^a	62,2 ^b
VIG (0-5)	37%	3,50 ^a	3,42 ^a	2,94 ^a
CONC (10 ⁶ /mL)	23%	561,9 ^b	680,0 ^b	787,7 ^a
DMA (%)	44%	12.75 ^a	8.38 ^a	8.97 ^a
DME (%)	35%	29.18 ^a	27.41 ^a	26.30 ^a
DEFT (%)	22%	41.93 ^b	35.80 ^a	35.27 ^a

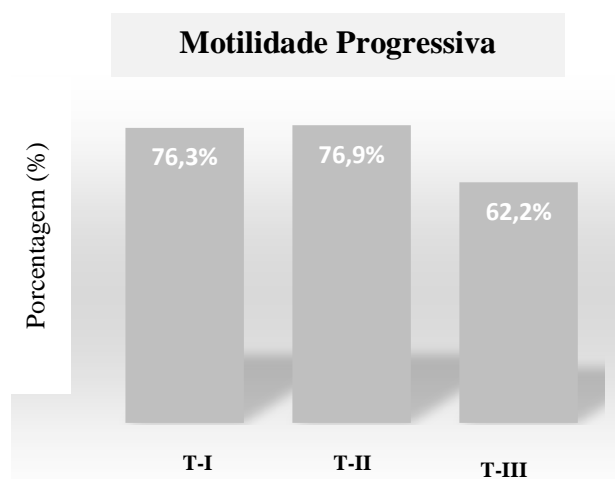
280 * Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste t ($P>0,05$).
 281 CV % diferentes para as variáveis VIG, CONC, DMA, DME e DEFT. Volume (VOL); turbilhão
 282 (TURB); motilidade (MOT); vigor (VIG); concentração espermática (CONC); Defeitos maiores
 283 (DMA); Defeitos menores (DME); Defeitos totais (DEFT). * Médias seguidas da mesma letra,
 284 na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey-Krumer ($P>0,05$).
 285

286 Os ejaculados obtidos por VA apresentaram aspecto leitoso, coloração variando
 287 de esbranquiçada a amarelo claro e odor *sui generis*, semelhantes às características
 288 desejáveis para carneiros descritas no manual do CBRA, (2013). Corroborando com

289 Oliveira *et al.*, (2013); Frazão Sobrinho *et al.*, (2014); Bartholazzi Júnior *et al.*, (2014).
 290 Os parâmetros morfológicos e físicos do sêmen quanto à (MOT, CONC e DEFT)
 291 diferiram ($p < 0,05$) entre os grupos, entretanto não foi evidenciado estatisticamente
 292 ($p < 0,05$; Tabela 2) quanto ao VOL, TURB, VIG, DMA e DME.

293

294



295

296

297

Figura 5. Motilidade Progressiva (%) do sêmen fresco dos ovinos Santa Inês tratados e não tratados com rbST.

298

299 As médias da concentração espermática (espermatozoides/mL) foram significativas
 300 ($p < 0,05$; Tabela 2), destacando-se o T-III (787.69 ± 480.72), que teve um maior número de
 301 células espermáticas, comparados aos grupos T-I (546.81 ± 252.54) e T-II (679.96 ± 23.17).
 302 Efeito atribuído ao tratamento com rbST, nas doses estabelecidas, promovendo uma
 303 maior ativação do hormônio, que induziu à nível testicular a produção espermática.
 304 Corroborando com Sharkweer *et al.*, (2004); Hafez *et al.*, (2005); Duarte *et al.*, (2006);
 305 Corrêa *et al.*, (2009); Rabassa *et al.*, (2012). Embora não tenha ocorrido uma correlação
 306 do PE com a concentração, se observarmos o T-III possui média superior comparado aos
 307 outros grupos (Tabela 1). Na análise da morfologia espermática, não houve diferença
 308 estatística ($p < 0,05$; Tabela 3) em nenhum dos grupos em relação aos DMA e DME. Os
 309 DEFT foram superiores ($41.93^a / CV 22\%$) nos três grupos e significativo ($p < 0,05$) no
 310 grupo controle. De acordo com o CBRA (2013) essas alterações morfológicas para o
 311 sêmen *in natura* coletado por VA não devem ultrapassar 20% dos defeitos totais e 10%
 312 dos defeitos maiores. Nos animais tratados com rbST os DMA apresentaram-se dentro do
 313 esperado, ao contrário dos DME que foram acima do desejado para ovinos. Este resultado

314 possivelmente reflete diante da média (Figura 5) da MOT verificada no T-III. Contudo
315 não foram verificadas alterações significativas que comprometessem a qualidade do
316 sêmen, haja vista que os parâmetros VOL, TURB, VIG, CONC e MOT apresentaram
317 valores adequados. Dentre as patologias predominaram as de cauda (enrolada, fortemente
318 dobrada/enrolada) e em menor quantidade a pseudogota, gota proximal e distal.
319 Geralmente as patologias de cauda estão relacionadas ao estresse térmico, manipulação
320 indevida do sêmen ou abstinência sexual prolongada (Mies Filho, 1982). Embora todos
321 os animais já estivessem em atividade reprodutiva, possivelmente algum deles apresentou
322 um baixo desempenho sexual em alguma das seis coletas, devido à competição e
323 manifestação do comportamento de dominância social, além de outros fatores como os
324 climáticos, influenciando nos resultados negativos da morfologia do sêmen, não
325 demonstrando assim um efeito isolado do rbST, haja visto que os animais tratados com o
326 hormônio apresentaram médias inferiores comparados aos controles.

327
328

CONCLUSÕES

329
330

Concluiu-se que a aplicação de 100 e 125mg/rbST em ovinos Santa Inês não
331 altera as medidas escrototesticulares e as características seminais. A dose de
332 125mg/rbST aumenta a concentração espermática.

333

334

REFERÊNCIAS

335

336 ABD EL-AZIZ, N.A.; YOUSSEF, M.M.; EL- MALKY, O.M. *et al.* In: Proc. of The 2
337 and Scientific Conf. of Animal Wealth Research in the Middle East & North Africa.
338 *Growth aspects, pubertal attainment and semen characteristics of buffalo calves treated*
339 *with somatotropin under different climatic conditions.* Cairo International Convention
340 Center, Egypt, 24- 26 October, (2009) p. 69-81.

341 AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A.; MORAES, E.A. *et al.* Perfil metabólico de touros da
342 raça Nelore (*Bos taurus indicus*) confinados e tratados com somatotrofina bovina
343 recombinante (r-bST). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 2, p. 434-442, 2007.

344 BARTHOLAZZI JUNIOR, A.; QUIRINO, C. R.; RIBEIRO, M. S. *et al.* Correlação entre
345 as características físicas do sêmen, medidas testiculares e volume testicular de

- 346 reprodutores da raça Santa Inês do norte do Rio de Janeiro. In: XXIV CONGRESSO
347 BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2014, Vitória ES. *Anais...Vitória-ES do XXIV*
348 Congresso Brasileiro de Zootecnia A Zootecnia Fazendo o Brasil Crescer", 2014.
- 349 BEARDEN, J.H.; FUQUAY, J.W.; WILLARD S.T. *Applied animal reproduction*. 6 ed.
350 Upper Saddle River: Pearson-Prentice Hall, 2004, 427p.
- 351 BLOOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a
352 new classification of the Bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, v.25, p.383-391, 1973.
- 353 CARVALHO, F.P.; QUIRINO, C.R.; CARVALHO, C.S.P. *et al.* Características seminais
354 de ovinos da raça Santa Inês na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras.*
355 *Reprod. Anim.*v.26, n.2, p.67-69, 2002.
- 356 CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio
357 Brasileiro de Reprodução Animal, 3. ed., Belo Horizonte, 2013. 104p.
- 358 CORRÊA, M.N.; FAROFA, T.S.; ROCKENBACH, T.L. *et al.* Efeito da aplicação da
359 somatotropina (ST) no desempenho reprodutivo de machos ruminantes e suínos. Núcleo
360 de pesquisa, ensino e extensão em pecuária. NUPEEC, Pelotas- RS, 2009.
- 361 DILBAR, G.H.; AHMAD, N.; MAQBOOL, A. *et al.* Effects of bovine somatotropin on
362 libido, serum testosterone, hematology and certain biochemical metabolites of sahiwal
363 bulls. *Pak. J. Agri. Sci.*, v. 51, n.2, p. 491-496, 2014.
- 364 DUARTE, P. N. Efeito da somatotropina recombinante bovina sobre a integridade da
365 membrana plasmática de espermatozoides bovinos pós-congelamento. XV Congresso de
366 Iniciação Científica/ VIII Encontro de Pós-Graduação. *Anais...Universidade Federal de*
367 Pelotas, RS, 2006.
- 368 FILEDS, M.J.; BURNS, W.C.; WARNICK, A.C. Age, season and breed effects on
369 testicular volume and semen traits in young beef bulls. *J. Anim. Sci.*, v.48, n.6, p.1299-
370 1304, 1979.
- 371 FRAZÃO SOBRINHO, J.M.; SOUZA, J.A.T.; COSTA, A.P.R. *et al.* Características do
372 sêmen de carneiros Dorper, Santa Inês e sem padrão racial definido, pré e pós

- 373 descongelamento, nos períodos chuvoso e seco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.4,
374 p.969-976, 2014.
- 375 GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à*
376 *Reprodução Animal*. 2.ed. São Paulo, Roca, 2008. 395p.
- 377 HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. 2006. *Reproduction in farm animals*. 7 ED. Blackwell
378 publications, Philadelphia, PA, USA.
- 379 HAFEZ, Y. M.; SOHEIR A.; FAWZY, M. A. *et al.* Effect of recombinant somatotrophic
380 hormone (rbST) on semen physical characteristics and some biochemical constituents in
381 seminal plasma of Friesian bulls. *Egypt. J. Anim. Prod.*, v.42, n.2, p.87-94, 2005.
- 382 HULL, K. L.; HARVEY, S. Review: Growth Hormone Roles in Male Reproduction.
383 *Endocrine*, v.13, n.3, p.243-250, 2000.
- 384 LINCOLN, G.A.; LINCOLN, C.E.; McNEILLY, A.S. Seasonal cycles in the blood
385 plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild,
386 feral and domesticated breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.*, New York, v.88, p.623-633,
387 1990.
- 388 MACDONALD, R. D; DEEVER, D. R. Testicular development in the bulls treated with
389 recombinant bovine somatotropin. *J. Anim. Sci.*, v.71, n.6, p.1540-1545, 1993.
- 390 MARTINS, J. A. M.; SOUZA, C.E. A.; CAMPOS, A.C.N. *et al.* et al. Biometria do trato
391 reprodutor e espermatogênese em ovinos sem padrão racial definido (SPRD). *Arch. Zoo.*,
392 v.57, n.220, p.553-556, 2008.
- 393 MIES, F.A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 5.ed. Porto Alegre: Sulina,
394 v.2,1982.
- 395 MORAES, J.C.F.; OLIVEIRA, N.M. Heritability of scrotal circumference in Corriedale
396 rams. *Small Rum. Res.*, Amsterdam, v.8, p.167-170, 1992.
- 397 OLIVEIRA, M.E.F.; SILVA, J.C.B. Andrologia. In: OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA,
398 P.P.M.; VICENTE, W.R.R. (Ed.). *Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos*. 1.ed.
399 São Paulo: Editora Medvet, p.35-60, 2013.

- 400 OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. *Biotécnicas Reprodutivas*
401 *em Ovinos e Caprinos*. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2013, 305p.
- 402 RABASSA, V.R. Efeito da Somatotropina Suína (pST) sobre o desenvolvimento
403 testicular, idade à puberdade e qualidade espermática de machos suínos. 2012. 63f. *Tese*
404 (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de
405 Pelotas, Pelotas.
- 406 RODRIGUES, L.F.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. *et al.* Parâmetros físicos,
407 morfológicos e bioquímicos do sêmen de ovinos da raça santa Inês criados no Estado do
408 Ceará. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2. 2005,
409 Teresina. *Anais...* Teresina: UFPI, 2005.
- 410 SAS (2015). Institute Inc. SAS/STAT® 14.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- 411 SHAKWEER, W.M.E.; HAFEZ, Y.M.; HAFEZ, I. M. *et al.* Physical and biochemical
412 characteristics of semen from rams treated with recombinant bovine somatotropin (rbST).
413 Available online with updates at [http://www. eaap. Org/](http://www.eaap.Org/), 2001.
414
- 415 SHAKWEER, W. M. E. *et al.* Physical and biochemical characteristics of semen from
416 rams treated with recombinant bovine somatotropin (rbST), *Faculty of Agriculture, Cairo*
417 *University*, 2004.
418
- 419 SOUZA, C. E. A. Avaliação da função reprodutiva de carneiros santa Inês durante o
420 primeiro ano de vida: estudo do desenvolvimento testicular, produção espermática e
421 caracterização das proteínas do plasma seminal. 2003, 160p. *Dissertação* (Mestrado).
422 Universidade Federal do Ceará. 2003.
- 423 SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.; LIMA, A.C.B. *et al.* Circunferência escrotal e
424 características seminais em carneiros Santa Inês. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.25, n.2,
425 p.196 198, 2001.
- 426 SOUZA, J.A.T.; CAMPELO, J.E.G.; MACEDO, N.A *et al.* Biometria testicular,
427 características seminais, libido e concentração de testosterona em ovinos da raça Santa
428 Inês, criados a campo, na microrregião de Campo Maior, Piauí. *Cienc. Vet. Trop.*, v.10,
429 p.21-28, 2007.

CAPÍTULO II*

Effect of recombinant bovine somatotropina (rbST) in cryopreserved semen of ovine Santa Ines

* Periódico Small Ruminant Research. ISSN: 0378-4320 (a ser submetido).

Effect of recombinant bovine somatotropina (rbST) in cryopreserved semen of ovine Santa Ines

L. A. Gomes^{a*}, J. A. T de Souza^b

^a Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, Federal University of Piauí, Campus Socopo, Teresina, PI

^b Department of Clinical and Veterinary Surgery, Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, Federal University of Piauí, Campus da Socopo, Teresina, PI .

^{a*} Corresponding author: le_medvet@hotmail.com

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of rbST on the cryopreserved semen characteristics of sheep Santa Ines. Using 18 animals were randomly divided into three groups, TI (2 mL /sol.NaCl 0,9%) T-II (100 mg/rbST) and T-III (125 m /rbST) applied subcutaneously every 14 days (D0, 14, 28, 42, 56, 70). The semen was collected by VA, and evaluated samples and diluted amid Tris-yolk for subsequent freezing the TK-3000. In the evaluation of sperm kinetics by CASA ($x \pm SD$) semen after thawing sheep Santa Inês or not treated with rbST, it was found that there were no significant differences ($p > 0.05$) as the MT parameters, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF among the groups, despite showing as expected for the sheep. The termorresistência test also showed no significant change ($p > 0.05$) and motility and vigor, the groups were compared, assessed at 0, 60, 120 and 180 min., 37 ° C. Regarding time was significant ($p < 0.05$) effect of TI (1.65 ± 0.74) presenting much lower in comparison with the TII and TIII at 60 and 120 minutes. However, TIII showed better results, and significant ($p < 0.05$) in 120 minutes (1.86 ± 0.59). As to sperm ultrastructure was evidenced significant effect ($p < 0.05$) in the groups evaluated during the integrity test of the plasma membrane and acrosomal mitochondrial potential, using probes epifluorescence stained with DCF-IP, FITC -PNA and JC-1 respectively. The use of rbST in sheep Santa Ines showed beneficial effect by promoting an improvement in plasma membrane integrity and acrosome. However, they did not alter the kinetics, motility and vigor of post-thaw sperm.

Keywords: rams, somatotropin, spermatoc, freezing

1. Introdução

O processo de criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização por período relativamente longo ou indeterminado, pela refrigeração e congelamento

respectivamente reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (Castelo *et al.*, 2008). Todavia, a criopreservação de sêmen é um processo que promove grande estresse celular e impõe aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (Purdy, 2006).

O crescimento da inseminação artificial tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento da tecnologia para utilização de sêmen congelado, cujo uso tem sido limitado devido aos baixos índices de fertilidade conseguidos com a inseminação intracervical nos ovinos, permanecendo variável e problemática (Maxwell; Watson, 1996; Salamon; Maxwell, 2000).

Desde o primeiro relato da congelação de sêmen ovino, têm surgido diversos investimentos tecnológicos, na tentativa de buscar soluções para o uso ideal de sêmen congelado nessa espécie, porém ainda com poucos resultados que possam ser reproduzíveis (Moraes, 2003). Os índices de fertilidade do sêmen ovino congelado ainda podem ser implementados com mudanças, principalmente nos aspectos que envolvem a técnica da criopreservação (Aisen *et al.*, 2005).

Os processos de criopreservação são conhecidos por gerar danos às células espermáticas, especialmente em relação às membranas e induzir alterações similares à capacitação e reação acrossômica na população de espermatozoides sobreviventes (Bailey *et al.*, 2000). Em sêmen de carneiros tem-se observado que a criopreservação causa capacitação precoce após o descongelamento (Watson, 2000) e que mudanças na membrana do espermatozoide muitas vezes pode não afetar a motilidade, mas encurtar a vida das células, reduzindo ou incapacitando a fertilização (Maxwell; Salamon, 2000).

As variações na qualidade seminal do sêmen congelado nesta espécie podem ser avaliadas por diferentes técnicas, entre elas sondas fluorescentes, teste de termorresistência e cinética espermática. A utilização de sondas de epifluorescência identifica a incidência de lesões das membranas plasmática e acrossomal, bem como de atividade mitocondrial, durante o processo de congelação e descongelação do sêmen (D'Alessandro; Martemucci, 2003).

Na tentativa de minimizar possíveis efeitos deletérios da criopreservação sobre a célula espermática muitos estudos buscam alternativas, como o uso parenteral de hormônios, dentre eles terapias com a somatotropina bovina recombinante, um importante agente mitogênico para as células germinativas e manutenção dos

espermatozoides além de melhorar as taxas de fertilização e qualidade seminal (Corrêa *et al.*, 2009).

2. Materiais e Métodos

2.1. Local do Experimento

A pesquisa foi conduzida após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEUA (nº006/14) no período de março a maio de 2014, nas instalações do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal - LBRA no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí - UFPI, em Teresina-PI, pertencente à região meio norte do Piauí, com latitude de 5°5'20 Sul e longitude de 42°48'07 Oeste, altitude de 72m e clima tropical úmido com temperatura mínima de 20°C e máxima 35°C.

2.2. Animais, Grupos experimentais e Manejo.

Foram utilizados 18 carneiros Santa Inês, com idade entre 22 e 36 meses, boa condição corpórea, peso vivo médio inicial de 28,5 e final de 61,5 Kg, previamente avaliados por meio de exame andrológico e ultrassonográfico. Manejados sob regime semi-intensivo, alimentados duas vezes ao dia, 500g concentrado/dia/animal, com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) triturado, oferecido no cocho, suplementados com ração comercial, composta por milho integral moído, farelo de trigo, de soja, de arroz, óleo vegetal degomado, calcário calcítico, sal comum e premix mineral vitamínico, contendo 17% de proteína bruta, 9% de fibra bruta, além de água e sal mineral à vontade. O controle sanitário incluiu medidas profiláticas contra doenças infectocontagiosas por meio de vacinas e desvermifugações no controle de endoparasitas. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, num fatorial 3x6, caracterizado por três tratamentos, seis animais e seis coletas. Sendo o TI (controle) recebendo 2 mL de solução de NaCl 0,9%, o TII tratado com 100mg/rbST e o TIII com 125mg/rbST (BOOSTIN[®] Intervet Schering Plough) aplicados via SC, a cada 14 dias, nos dias D0, 14, 28, 42, 56 e 70 de acordo com Macdonal e Deaver (1993).

2.3. Protocolo Experimental

2.3.1. Coleta e Avaliação do Sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas por meio de vagina artificial (VA), aquecida a 40-42°C, mantidas inicialmente a 37°C em banho-maria para a avaliação, com auxílio de uma ovelha manequim, após prévia limpeza do prepúcio dos carneiros. Os ejaculados foram avaliados macroscopicamente quanto ao aspecto, cor, odor e volume e microscopicamente quanto à motilidade, vigor, turbilhão, concentração e morfologia

espermática de acordo com os critérios adotados pelo manual de reprodução do CBRA, (2013). A concentração espermática foi verificada por meio da técnica de Câmara de *Neubauer*, com resultado expresso em número de espermatozoides/mL.

2.3.2. Diluição e Criopreservação do Semen

Após cada coleta de sêmen, as amostras foram diluídas em meio de criopreservação Tris-Gema (3,605g de Tris, 2,024g de ácido Cítrico, 1,488g de frutose, 100 mL de água destilada, 20% de gema de ovo e 5% de glicerol). Em seguida acondicionadas em palhetas de 0,25mL, identificadas, envasadas manualmente e congeladas em máquina TK 3000[®] (TK Tecnologia em congelação, Brasil), com curva de congelamento rápido (-0,25°C/min., de 25°C a 5°C e -20°C/min., de 5°C a -120°C) e por fim atingindo -120°C, as palhetas com as amostras foram raqueadas e armazenadas em botijões de nitrogênio líquido à -196°C.

2.3.3. Avaliação do Sêmen Pós-Criopreservação

As amostras de sêmen criopreservadas foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e avaliadas pelo teste de termorresistência, cinética espermática e quanto à integridade do acrossoma, membrana plasmática e potencial mitocondrial.

2.3.4. Teste de Termorresistência (TTR)

A longevidade dos espermatozoides das amostras de sêmen descongeladas consistiu em colocar uma alíquota de 0,2 mL num frasco de *ependorf* de 1,5 mL e incubar a 37°C por um período total de 180 minutos. E com uma gota em lâmina e lamínula avaliou-se a motilidade progressiva retilínea (0-100%) e o vigor (0-5) em microscópio óptico com placa aquecedora acoplada, a 37°C, com aumento de 100 a 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

2.3.5. Avaliação da cinética Espermática

Consistiu na captura de imagens das amostras de sêmen descongeladas a 37°C durante 5 minutos, analisadas pelo *software Computer Assisted Sperm Analyses* (CASA) que determinou a concentração e a motilidade dos espermatozoides, além de reconstruir sua trajetória ao longo do tempo, com cálculos e parâmetros, por microscopia óptica de contraste de fase, 10X (Nikon[™] H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmara de vídeo (Basler Visão Technologie[™] A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de esperma Classe[™] software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona). Os parâmetros avaliados foram: motilidade total (%), proporcional às células móveis do total; motilidade progressiva (%), referente à porcentagem de células movendo-se

progressivamente; velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL- $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN-%), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH- μm) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz) analisado individualmente para cada espermatozoide.

2.3.6. Avaliação da Ultraestrutura Espermática Pós-Criopreservação

2.3.6.1. Integridade da Membrana Plasmática

Alíquotas de 50 μL de sêmen descongelados foram diluídas em 150 μL de Tris contendo 5 μL de Diacetato de Carboxifluoresceína -DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 μL de Iodeto de Propídio – IP (0,5mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Amostras com contagem de 200 espermatozoides foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, Japão), com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm, e classificadas como membrana intacta quando corados em verde e com membrana danificada quando corados em vermelho.

2.3.6.2. Integridade do Acrossoma

Alíquotas de 5 μL de sêmen descongelado foram preparadas para esfregaço, secas ao ar e armazenadas por 24 horas a 4°C. Uma alíquota de 20 μL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada a 480 μL de PBS para obter a concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas (10-20 μL) desta solução foram colocadas sobre lâminas e incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Posteriormente as lâminas foram mergulhadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μL de meio de montagem (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de Azida Sódica e 5mg de phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula. Em seguida foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 100x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus, Japão), usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Classificados como íntegros, quando a região do acrossoma é corada com fluorescência verde, reagidos quando verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou quando não apresentarem fluorescência verde em toda a região da cabeça.

2.3.6.3. Potencial Mitocondrial

Alíquotas de 50 μL de sêmen descongelados foram diluídas em 150 μL de Tris contendo 5 μL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência

(Olympus, Japão), com aumento de 400x usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células espermáticas coradas em laranja foram classificadas com alto potencial e as coradas em verde com baixo potencial de membrana.

2.4. Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando o MIXED do software Statistical Analysis System (SAS/STAT®, Institute Inc.Cary, NC, USA, 2015). As médias foram estimadas por quadrados mínimos das variáveis estudadas comparadas pelo teste t e de Tukey-Kramer para dados não balanceados e teste de Tukey em níveis de 5% de probabilidade. Na análise da ultraestrutura espermática foi realizado o PROC/GLM e as médias pelo Teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

Os resultados do sêmen pós-descongelamento avaliados pelo TTR, quanto à motilidade não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos durante os 180 minutos do tempo de incubação. No primeiro tempo (0) foi verificada motilidade de 27,34%, 27,22% e 26,25% e vigor com escores de 2,18, 2,22 e 2,33, respectivamente no T-I, T-II e T-III, conforme descrito na Tabela 1. O grupo controle apresentou um vigor inferior em todos os tempos, apresentando valor significativo ($1,65 \pm 0,74$; $p < 0,05$) aos 60 minutos. Os resultados das amostras dos animais tratados com 125mg/rbST foram superiores e significativo aos 120 minutos ($1,86 \pm 0,59$; $p < 0,05$) em relação aos grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Média ($x \pm CV$) dos parâmetros Motilidade e Vigor do sêmen pós-descongelamento de ovinos Santa Inês tratados ou não tratados com rbST, pelo Teste de Termorresistência incubado a 37° C nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

Parâmetros	Tempo (min.)	TI-Controle	TII-100mg/rbST	TIII-125mg/rbST
M (%)	0	27,34 \pm 12,04 ^a	27,22 \pm 14,85 ^a	26,25 \pm 12,44 ^a
VIG (0-5)	0	2,18 \pm 0,85 ^a	2,22 \pm 1,09 ^a	2,33 \pm 0,71 ^a
M (%)	60	18,43 \pm 10,80 ^a	23,19 \pm 12,37 ^a	22,63 \pm 11,05 ^a
VIG (0-5)	60	1,65 \pm 0,74 ^b	2,02 \pm 0,84 ^a	2,19 \pm 0,62 ^a
M (%)	120	13,43 \pm 9,70 ^a	15,27 \pm 9,85 ^a	18,05 \pm 8,55 ^a
VIG (0-5)	120	1,21 \pm 0,83 ^b	1,41 \pm 0,84 ^b	1,86 \pm 0,59 ^a
M (%)	180	10,78 \pm 9,51 ^a	10,83 \pm 7,69 ^a	12,77 \pm 8,57 ^a
VIG (0-5)	180	1,12 \pm 0,83 ^a	1,13 \pm 0,63 ^a	1,47 \pm 0,69 ^a

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($p > 0,05$). MP=Motilidade (%) V=Vigor (0-5).

Verificou-se que o vigor analisado das amostras do grupo TIII demonstrou maior uniformidade, e manutenção dos valores (Figura 3), comparado aos outros tratamentos, evidenciando uma melhor sobrevivência dos espermatozoides ao longo dos tempos em que foram avaliadas, cada dia de aplicação e coleta de sêmen (Figura 1 e 2). Nos chamou atenção para o D28, pois em todos os grupos, foi o dia que apresentou os piores escores quanto ao vigor, demonstrando um declínio a partir dos 60 minutos da análise no TTR.

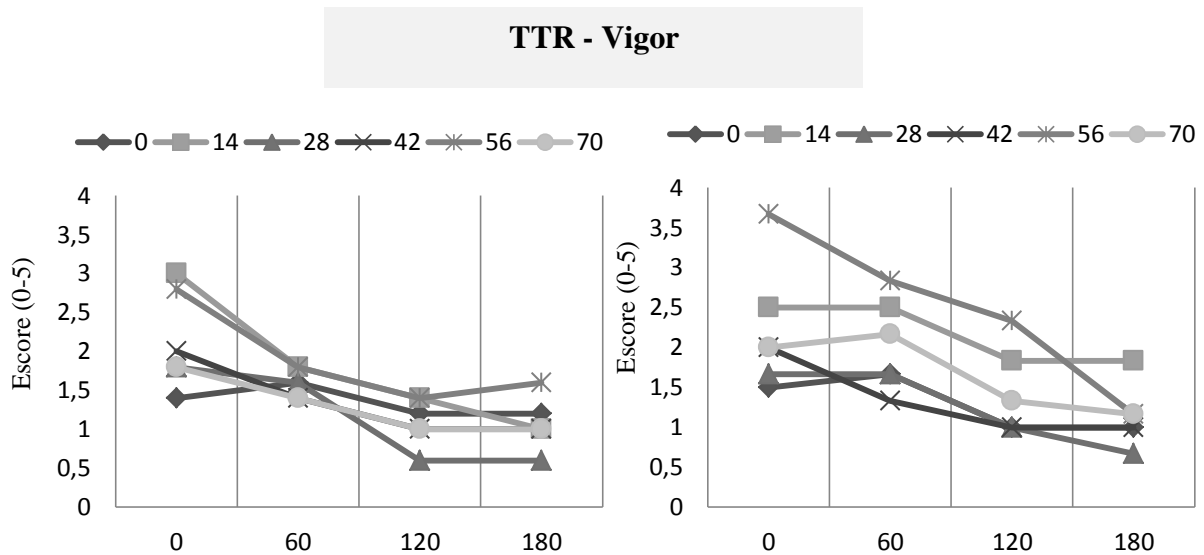


Figura 1. TTR quanto ao VIG do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês do grupo T-I nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento das amostras coletadas no D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

Figura 2. TTR quanto ao VIG do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês do grupo T-II nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento das amostras coletadas no D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

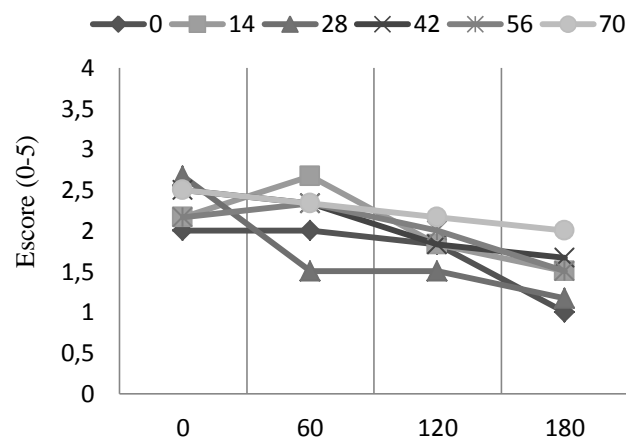


Figura 3. TTR quanto ao VIG do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês do grupo T-III nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento das amostras coletadas no D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

Na avaliação da cinética espermática realizada pelo sistema CASA, com os seguintes parâmetros (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH e BCF) não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Média ($x \pm CV$) dos parâmetros da Cinética espermática do sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês tratados ou não com rbST avaliados pelo software CASA.

Parâmetros	TI- Controle	TII- 100mg/rbST	TIII-125mg/rbST
MT (%)	55.49 ^a \pm 20.98	54.96 ^a \pm 25.50	54.87 ^a \pm 23.98
MP (%)	12.90 ^a \pm 7.21	14.79 ^a \pm 8.52	12.54 ^a \pm 7.38
VCL ($\mu\text{m/s}$)	62.01 ^a \pm 10.27	65.92 ^a \pm 17.30	68.00 ^a \pm 12.45
VSL ($\mu\text{m/s}$)	27.12 ^a \pm 8.77	30.21 ^a \pm 11.34	29.65 ^a \pm 9.35
VAP ($\mu\text{m/s}$)	39.23 ^a \pm 9.36	42.72 ^a \pm 12.96	43.35 ^a \pm 10.43
LIN (%)	42.49 ^a \pm 8.07	43.78 ^a \pm 11.35	43.01 ^a \pm 7.76
STR (%)	67.41 ^a \pm 7.27	67.75 ^a \pm 13.26	67.40 ^a \pm 6.15
WOB (%)	62.52 ^a \pm 5.86	62.46 ^a \pm 12.35	63.34 ^a \pm 5.97
ALH (μm)	2.93 ^a \pm 0.30	3.03 ^a \pm 0.70	3.15 ^a \pm 0.41
BCF (Hz)	8.85 ^a \pm 1.22	9.09 ^a \pm 1.89	8.68 ^a \pm 1.13

* Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ($P > 0,05$). MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média do percurso; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF = batimento flagelar cruzado.

Os resultados demonstraram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) na avaliação da ultraestrutura espermática do sêmen criopreservado, nos três grupos dos ovinos em estudo, quanto aos testes de integridade da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial utilizando as sondas fluorescentes DCF-IP, FITC-PNA e JC-1 respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Média ($x \pm CV$) da Integridade da membrana plasmática, do acrossoma e potencial mitocondrial dos espermatozoides de ovinos Santa Inês tratados e não tratados com rbST, corados pelas sondas de fluorescência.

Testes	TI- Controle	TII -100mg/rbST	TIII- 125mg/rbST
Membrana Plasmática (%)	137.63 \pm 39.08 ^b	151.47 \pm 42.39 ^{ab}	160.83 \pm 41.68 ^a
Acrossoma (%)	129.63 \pm 36.46 ^c	148.66 \pm 37.12 ^b	172.47 \pm 22.21 ^a
Potencial Mitocondrial (%)	160.10 \pm 26.14 ^a	149.02 \pm 47.08 ^{ab}	168.33 \pm 32.37 ^a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p > 0,05$).

Os animais tratados com 125mg/rbST se destacaram dentre os resultados quando comparados aos grupos, apresentando melhores resultados para membranas plasmáticas e acrossomas íntegros (Figura 4B) e alto potencial mitocondrial (Figura 2D), descritos na (Tabela 3). O grupo TII-100mg/rbST também apresentou espermatozoides com boa integridade de membrana e do acrossoma, porém o potencial mitocondrial foi baixo (Figura 5C), diante dos dados do grupo T-I e T-III conforme a Tabela.3. Nos animais do grupo controle, foi evidenciada uma maior porcentagem de espermatozoides danificados quanto à integridade das membranas, no entanto com potencial mitocondrial semelhante ao do grupo TIII e melhor do que o TII (Tabela 3).

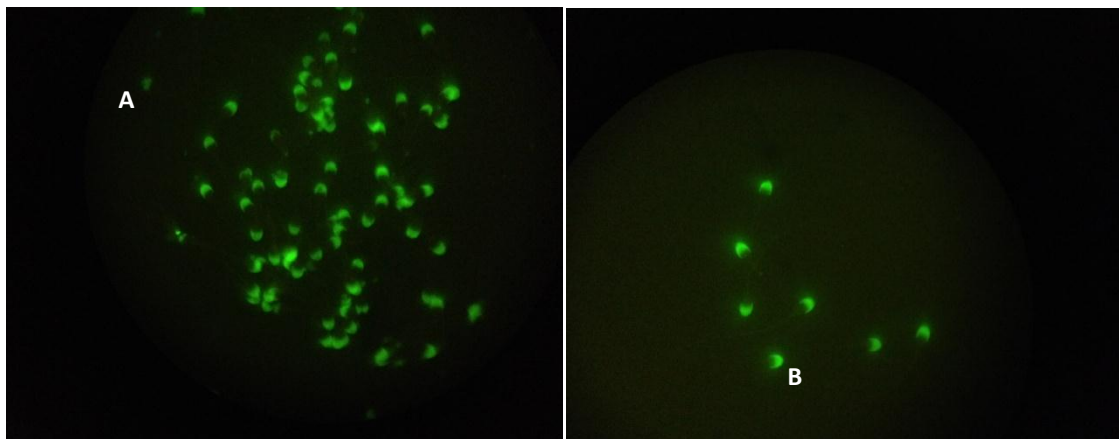


Figura 4. Espermatozoides criopreservados de ovinos, corados com FITC-PNA, demonstrando acrossoma danificado (A) e íntegros (B) observados em microscópio de epifluorescência em aumento 40X.



Figura 5. Espermatozoides criopreservados de ovinos, corados com JC-1, apresentando baixo (C) e alto (D) potencial mitocondrial, observados em microscópio de epifluorescência, aumento 40X.

4. Discussão

O teste de termorresistência é um teste que funciona como uma importante ferramenta na avaliação da qualidade seminal, sendo frequentemente utilizado na tentativa de prever a resistência e sobrevivência das células espermáticas, avaliando a motilidade e vigor dos espermatozoides quanto à longevidade por tempo determinado, influenciando na fertilidade (Barnabé *et al.*, 1981). Em nossos resultados, em nenhuma dessas variáveis foi verificada diferença significativa. Este resultado pode estar relacionado aos efeitos inerentes ao processo de congelamento e as alterações morfológicas.

Dentre os critérios preconizados, a motilidade espermática esperada para o sêmen congelado de ovinos deve ser $\geq 30\%$ e o vigor ≥ 3 (CBRA, 2013). Dados que não corroboram com o presente estudo, uma vez que a motilidade se apresentou abaixo do desejável 26,94% e o vigor com escores entre 1,5 e 2,5. Esta redução da motilidade, comparada a outros experimentos, pode ser decorrente da presença de espermatozoides anormais, uma vez que não apresentam motilidade progressiva, conforme descrito por Bearden *et al.*, (2004).

A avaliação da motilidade progressiva no sêmen descongelado é um método simples e rápido na avaliação do sêmen, no entanto, quando utilizada isoladamente não é capaz de detectar possíveis problemas decorrentes às crioinjúrias, somente manifestando esses efeitos mediante a permanência da amostra em incubação para análise, como realizado no TTR. Esta análise geralmente é realizada de maneira convencional, estimada subjetivamente e visualmente sob microscopia óptica, com isso pode influenciar nos dados, determinando variações, mesmo quando realizado por um único e experiente técnico (Arruda, 2000).

No presente estudo verificou-se que tanto o vigor quanto a motilidade apresentaram comportamentos semelhantes, sendo elevados nas primeiras horas e reduzindo-se nas horas subsequentes. E quando comparados os grupos, nos dias de tratamentos e coletas (D0, 14, 28, 42, 56 e 70) e ao longo do tempo de análise no teste, observou-se que o TI apresentou resultados bem inferiores, principalmente no intervalo do tempo de incubação de 0 aos 60 minutos, mostrando uma redução acentuada após os 14 dias de aplicação (Figura 1). Nos animais do TII-100mg/rbST observou-se que houve melhora no vigor, porém com dados mais dispersos, reduzindo-se a partir dos 60 minutos. Quando comparado o vigor do TIII com o TI e TII, foi observada maior uniformidade dos dados, demonstrando que houve uma melhor sobrevivência dos espermatozoides no

decorrer do tempo (Figura 1, 2 e 3). Este comportamento mostra um efeito positivo do hormônio rbST sobre o vigor dos espermatozoides após o descongelamento, mas não tão expressivo ao ponto de apresentar um bom escore nas amostras avaliadas, apresentando abaixo do preconizado para a espécie. Contrastando com estudos realizados com outras espécies que mostraram melhora da motilidade espermática (Duarte *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2009).

A insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e a testosterona, funcionam como mediadores do GH, apresentando papel primordial na estrutura e integridade das membranas, na cinemática, motilidade espermática (Tena; Barreiro, 2002; Tilburg *et al.*, 2008), além de agir melhorando as taxas de sobrevivência após o ciclo de congelamento e descongelamento (Albdelmonein *et al.*, 1998). Como os mecanismos desempenhados pela ST na célula espermática ainda são complexos e escassos para algumas espécies são necessários o desenvolvimento de mais pesquisas na determinação da dose e tempo de tratamento ideal para cada animal.

Na cinética espermática não houve diferença estatística ($p > 0,05$) dentre os parâmetros avaliados, em nenhum dos grupos, porém apresentaram índices adequados para ovinos, apresentando motilidade total acima dos 30% para sêmen congelado, corroborando com os dados do CBRA (2013). Em contrapartida a motilidade progressiva apresentou-se inferior e essa redução pode ser decorrente de alterações morfológicas (Bearden *et al.*, 2004), além das altas temperaturas comuns à nossa região, causando um declínio acentuado e o aumento de células espermáticas inviáveis (Coelho *et al.*, 2008). Além desses fatores, a presença de partículas de substâncias no meio em análise, pode comprometer os resultados, uma vez que o sistema automatizado CASA, reconhece-as como células imóveis (Arruda, 2011). A hiperativação espermática, também é algo importante e comum no pós-descongelamento, apresentando movimentos vigorosos e não lineares. Possivelmente alguns desses fatores tenham prejudicado nos resultados, quanto as variáveis analisadas no presente estudo.

Quanto à ultraestrutura espermática foi evidenciado efeito significativo (Tabela 3; $p < 0,05$) nos grupos avaliados, durante os testes de integridade da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial, utilizando as sondas de epifluorescência, corados com DCF-IP, FITC-PNA e JC-1 respectivamente. Os resultados encontrados demonstraram que no grupo dos ovinos tratados com 125mg/rbST obtiveram uma boa porcentagem de espermatozoides com membranas íntegras, apresentando 85% quanto à membrana plasmática, 86,2% de acrossomas íntegros e 84,1% de potencial

mitocondrial, dados esses que mostram uma correlação positiva quanto à viabilidade espermática, entretanto se contradizendo com os resultados da motilidade e o vigor, que foram um pouco abaixo do esperado para o sêmen congelado.

Pesquisas utilizando tratamentos com rbST, demonstram que há um aumento na quantidade de espermatozoides, apresentando membrana plasmática íntegra, sugerindo um possível acréscimo nas taxas de fertilização, concordando com Souza et al. (2005), que demonstrou que o GH além de reduzir as anormalidades espermáticas elevou a motilidade e a fertilização. Devido à concentração espermática ser constante para o congelamento de sêmen, as taxas de fertilização estão diretamente atribuídas às possíveis alterações morfológicas dos espermatozoides. E estas podem ser atribuídas ao efeito do GH na espermatogênese quanto ao metabolismo espermático (Weinbauer et. al 1990).

No grupo TII foi verificado um bom resultado quanto à integridade de membranas, porém com potencial mitocondrial inferior, quando comparado ao grupo TI e TIII. A importância das mitocôndrias espermáticas se deve ao fato de que a energia necessária para a motilidade dos espermatozoides ocorre através da geração de ATP, desta forma, as alterações nas membranas espermáticas podem provocar consequente diminuição do potencial mitocondrial (Succu *et al.*, 2011).

Os animais que não foram tratados com rbST foram os que mais apresentaram alterações nas membranas das células espermáticas (Figura 3). Com essas células espermáticas danificadas, o processo de fertilização fica comprometido, já que a integridade da membrana citoplasmática e acrossomal são importantes, estando relacionada ao potencial de fecundação, pois a membrana plasmática é responsável pela manutenção da homeostase celular e o acrossoma, necessário para os eventos inerentes da fertilização (Correa *et al.*, 1997).

A escassez de dados mais minuciosos sobre o mecanismo de ação da somatotropina bovina recombinante no sêmen da espécie ovina, principalmente quando se refere ao criopreservado, se torna difícil na elucidação para alguns resultados, contudo, percebe-se que há um crescente interesse nesse estudo com outros animais. Em bovinos tratados com rbST, demonstraram um aumento na quantidade de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, sugerindo alterações positivas na elevação nas taxas de fertilização, mostrando assim seu efeito benéfico (Duarte *et al.*, 2006). Estudos mostram que o GH pode agir indiretamente elevando as concentrações de IGF-I, e influenciando na espermatogênese e da esteroidogênese (Sauerwein *et.al*, 2000). Os mecanismos que

justificam estes efeitos são complexos e o envolvimento do referido hormônio na espermatogênese é atribuído ao efeito dos hormônios gonadotróficos, como o FSH, LH, testosterona e ao IGF-I (Fraser *et. al* 1991).

5. Conclusão

A aplicação de rbST em ovinos da raça Santa Inês apresenta efeito benéfico, promovendo manutenção da integridade da membrana plasmática e do acrossoma. Não alterara o vigor, a motilidade e a cinética pós-descongelação.

6. Referências

- Abdelmonein, I.Y. et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *J Androl*, v.19, n. 2, p.21-207, 1998.
- Aisen, E.G.et al. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v.50, n.3 , p.239-249, 2005.
- Arruda, D. F., et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- Arruda, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- Bailey, J.L, Bilodeau J.F, Cormier, N. Semen preservation in domestic animals: a damaging and capacitating. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, jan./mar. 2011.
- Barnabé, V.H., Barnabé, R.C., Visintin, J.S. et al. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.4, n.3-4, p.7-12, 1981.
- Bearden, J.H, Fuquay, J.W, Willard, S.T. *Applied animal reproduction*. 6.ed. Upper Saddle River: PearsonPrentice Hall, 2004. 427p.
- Castelo, T.S., Frota, T.R, Silva A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, v.2, p.67-75, 2008.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3. ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Coelho, et al. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em bodes submetidos ao estresse calórico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.60, p.1338-1345, 2008.

Correa, J.R. et al. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programs. *Theriogenology*, v.48, p.721-731, 1997.

Correa, M. N. et al. Efeito da aplicação da somatotropina (ST) no desempenho reprodutivo de machos ruminantes e suínos. Núcleo de pesquisa, ensino e extensão em pecuária. <http://www.ufpel.edu.br/nupeec>. Pelotas, RS, 2009.

D'Alessandro, A.G., Martemucci, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim. Reprod. Sci.*, v.79, p.93-102, 2003.

Duarte, P. N. Efeito da somatotropina recombinante bovina sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides bovino pós congelamento. XV Congresso de Iniciação Científica/ VIII Encontro de Pós-Graduação. Universidade Federal de Pelotas, RS, 2006.

Fraser, R.A, Siminoski K, Harvey S. Growth hormone receptor gene: novel expression in pituitary tissue. *J Endocrinol* 1991;128:R9–R11.

Frazão Sobrinho et al. Características do sêmen de carneiros Dorper, Santa Inês e sem padrão racial definido, pré e pós-congelamento, nos períodos chuvoso e seco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.66, n.4, p.969-976, 2014.

Gadella, B.M. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.249-265, 2001.

Luz, S. L. N. et al. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v.37, n.2, 2000. .
Macdonald, R. D; Deaver, D. R. Testicular development in the bulls treated with recombinant bovine somatotropin. *J Animl Sci*, v.71, n.6, p.1540-1545, 1993.

Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.55 - 65, 1996.

Moraes, J.C.F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. *Rev Bras Reprod Animl*, v.27, n.4, p.613-619, 2003.

Purdy, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.

Sauerwein H, M. et al. D Divergent effects of estrogens on the somatotropic axis in male and female calves *J Reprod Dev* 1992;38:271– 8,2000.

Succu, S. et al. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res*, v. 50, p.310-318, 2011.

Tena-Sempere, M., Barrero, M. L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular And Cellular. Endocrinology*, v.188, n. 1-2, p. 9-13, 2002.

Tilburg, M. F. V. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. *Ciência Anim Bras*, v. 9, n. 3, p. 731-739, 2008.

Verstegen, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2000.

Watson, P.F. The cause reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v. 61, n. 2, p. 481-492, 2000.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa que objetivou avaliar o sêmen de ovinos da raça Santa Inês, tratados com somatotropina bovina recombinante pode-se observar que a administração nas doses de 100 e 125mg de rbST não alterou as medidas testiculares que propiciasse uma correlação do efeito hormonal com seu aumento de tamanho, nem modificações nos parâmetros avaliados quanto às características seminais. Entretanto os ovinos que receberam 125mg de rbST apresentaram um aumento da concentração espermática, resultado comum de se verificar nos trabalhos realizados com algumas espécies, e isto está relacionado ao mecanismo de ação do GH, que atua nas células promovendo a proliferação celular, estimulando a gametogênese e esteroidogênese.

Na análise das alterações morfológicas espermáticas, os resultados mostraram que os dois tratamentos com rbST, apresentaram defeitos maiores com valores inferiores quando comparados aos animais do grupo controle, porém a quantidade de alterações totais foi superior, mostrando que o hormônio não diminuiu esses defeitos. Resultando dentre as variáveis avaliadas numa motilidade e o vigor abaixo do preconizado. No entanto, não podemos afirmar se o hormônio foi ineficiente, pois muitos fatores podem ter contribuído para este dado, inclusive os efeitos externos e relacionados ao processamento do sêmen na criopreservação.

Em contrapartida, o rbST atuou de forma benéfica sobre a célula espermática, promovendo uma melhoria na integridade da membrana plasmática e do acrossoma, e no potencial mitocondrial. Entretanto, o hormônio não promoveu alterações na cinética, motilidade e vigor dos espermatozoides pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS

ABDELMONEIN, I. Y. et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, n. 2, p.21-207, 1998.

AISEN, E. **Criopreservacion de sêmen ovino. Efecto de diluyents hipertonicos sobre la integridad espermática.** Tese (Doutorado), Faculdade de Veterinaria, UBA, 2001.

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências

agrárias) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 2006.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M. et al. Acrossosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.541-545, 2000.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion sêmen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.105-113, 2005.

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.

AMORIN, L. S. et al. Perfil metabólico de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) confinados e tratados com somatotropina bovina recombinante (rbST). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.432-442, 2007.

AQUILA, S. et al. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculation spermatozoa. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p.552-557, 2005.

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

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011.

BICUDO, S.D. et al. Possibilidades e limitações com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.120-127, 2003.

BICUDO, S.D. et al. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.127-130, 2005. Suplemento.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F. et al. Utilização de glicerol e etileno glycol como crioprotetores na congelação do semen caprino. **Ciência Animal Brasileira**. V.5, n.1, p.27-32, 2004.

BLOOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a new classification of the Bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, p.383-391, 1973.

BORTOLOZZO, F. P. et al. Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO, F. P. et al. **Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre, p.69-87, 2005.

BREIER, B. H.; VICKERS, M. H.; GRAVANCE, C. G. et al. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? **Endocrinology**, J. 45 (Suppl.), S53– S60, 1998.

CARNEIRO, G. F. et al. Utilização prática de sêmen congelado. In: Assist (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. **Anais...**Gravatá, PE: Assist, 2007, CD-ROM.

CASTELO, T. S et al. Considerações sobre: Criopreservação de sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3. ed., Belo Horizonte: CBRA, p,104, 2013.

CELEGHINI, E. C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, p.673, 1996.

CORRÊA, M. N. et al. **Efeito da aplicação da somatotropina (ST) no desempenho reprodutivo de machos ruminantes e suínos**. Núcleo de pesquisa, ensino e extensão em pecuária. <http://www.ufpel.edu.br/nupeec>. Pelotas, RS, 2009.

DACHEUX, J. L; DACHEUX, F. Protein secretion in the epididymis. In: Robaire, B; Hinton, B. T. **The epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York., p.151-168, 2002.

DUARTE, P. N. **Efeito da somatotropina recombinante bovina sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides bovino pós congelamento**. XV Congresso de Iniciação Científica/ VIII Encontro de Pós-Graduação. Universidade Federal de Pelotas, RS, 2006.

DUPONT, J. et al. Insulin and IGF-I induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by Cdna microarray analysis. **Endocrinology**, v.142, n.11, p. 4968-4975, 2001.

DYCE, K. M. et.al. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.856, 2010.

EARLY, R.J.; McBRIDE, B.W.; BALL, R.O. Growth and metabolism in somatotropin-treated steers: I. Growth, serum chemistry and carcass weights. **Journal of Animal Science**, v.68, p.4134-4143, 1990.

EMSEN, E. Testicular development and body weight gain from birth to 1 year of age Awassi and Redkaraman sheep and their reciprocal crosses. **Small Ruminant Research**, v. 59, n. 1, 79-82p, 2005.

FAHY, G. M. Analysis of "solution effects" injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. **Biophysical Journal**, v.32, p.837-850, 1980.

FARSTAD, W. Criopreservação de sêmen canino - novos desafios. **Reproduction of Domestic Animals**. V.44, suppl 2, p.336-41, 2009.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. A Importância da Correta Avaliação do Patrimônio Genético antes da Transferência de Embriões. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.27, n.1, p. 101-109, 1999.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.131-32, 1997.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p.81-89, 2007.

FORNI, S.; ALBUQUERQUE, L. G. Avaliação de características biométricas de testículos de bovinos Nelore. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5, 2004, Pirassununga- SP. **Anais...** Pirassununga-SP: SBMA, 2004. CD Rom.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

GONÇALVES, P. B. D. et al. **Biotécnicas aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: ROCA, p. 395, 2008.

GONZALEZ, C. I. M. **Características biológicas e bioquímicas do sêmen ovino em diferentes tempos de incubação a +37 graus C**. 1984. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

GORDON, I. **Controlled reproduction farm animals series: controlled reproduction in sheep and goats**. 1. ed. New York: CABI Publishing, p.450, 1990.

GUSMÃO, A. L.; ANDRADE, M. J. C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, n. 1, p. 29-33, 2005, (Suplemento).

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, . p.513, 2004

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004, 530p.

HENRICKS, D. M. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 2, p. 330-337, 1998.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.

HULL, K. L.; HARVEY, S. Review: Growth Hormone Roles in Male Reproduction. **Endocrine**, v.13, n.3, p.243-250, 2000.

IBRAHIM, N.M. et al. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 863-877, 2001.

JELINKOVÁ, P. et al. Proteinase Inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.32, n.1, p. 99-107, 2003.

JOBIM, M. I. M. et al. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae veterinariae**, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. /. **Reproduction, Fertility and Development**, v.50, p. 261-268, 1977.

KIRBY, J. D.; MANKAR, M. V. ; HARDESTY, D. et al. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. **Biology of Reproduction**, v. 55, p.910-916, 1996.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido**. Porto Alegre: ARTMED, 4 ed. v. 2, 2004. 788p.

KRAUS, M. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal Reproductive Immunology**, v.65, n.1, p.33-46, 2005.

KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of *in vitro* fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medicine Journal**, v.24, p.1-6, 2000.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **Journal of Membrane Biology**, v.165, p.1-10, 1998.

LEBOEUF, B. et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-2, p.113-141, 2000.

LECHNIAK, D. et al. Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of ai bulls. **Theriogenology** 52, 1145-1152, 1999.

- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 7. Ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- LIN, T. et al. Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. **Endocrinology**, v.119, n.4, p.1641-1947,1986.
- LOBIE, P. F. et al. Cellular localization of the growth hormone receptor binding protein in the male and female. **Endocrinology**, v.126, n.4, p.2214-2221, 1990.
- LÔBO, R. N. B. et al. Correlações entre o desenvolvimento do perímetro escrotal e caracteres de crescimento em ovinos da raça Morada Nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.2, p.265-271, 1997.
- LUCY, M. C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.7, p.1635-1647, 2000.
- LUZ, S. L. N. et al. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.37, p.141-145, 2000.
- MACPHERSON, M. L. et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, n.2, p.648-654, 2002.
- MAIA, M, S. Avaliação andrológica em carneiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Sup. 5, 2002.
- MANN, T.; MANN, C. Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: applications to andrological problems. In: **Male Reproductive Function and Semen**. Berlin: Springer, p.269-336, 1981.
- MARCHANT, T. A.; PETER, R. E. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus* **Journal of Experimental Zoology** 237, 231–239. (1986).
- MARTIN, F. C. et al. Growth hormone secretion in the elderly: ageing and the somatopause. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.11, n.2, p.223–50,1997.
- MARTINS, J. A. M. et al. Biometria do trato reprodutor e espermatogenese em ovinos sem padrão racial definido (SPRD). **Archivos de Zootecnia**, v.57, n.220, p.553-556, 2008.
- MATOS, D. L. et al. Análise Computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. Computer-assited sperm analysis (CASA): a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.
- MATSUSHIMA, M. et al. Spermatogenesis in Snell dwarf, little and congenitally hypothyroid mice. **International Journal of Andrology**. v. 9, p.132–140,1986.

- MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.42, n.1, p.55-65, 1996.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVERIA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, p.327-44, 2002.
- MESQUITA, F. L. T. **Desenvolvimento testicular, idade à puberdade e características seminais em carneiros F1 (Dorper x Somalis Brasileira) criados no nordeste do Brasil**. 2004. 66p Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.
- MORAES, A. et al. Lavoura-pecuária em sistemas integrados na pequena propriedade. In: ENCONTRO LATINOAMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 3., 1998, Pato Branco. **Anais...** Pato Branco: CEFET – PR, 1998. CD-ROOM
- MOURA, A. A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, v. 98, n. 1, p. 169-188, 2007a.
- MOURA, A. A. et al. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. *Molecular Reproduction Development*, v.74, n. 2, p. 214-222, 2007b.
- MOURA, P. P. et al. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. *Ciência Rural*. v. 40, n. 5, p. 1154-1159, 2010.
- MYES FILHO, A.; BARRETO, J. F. **Noções sobre reprodução dos animais e inseminação artificial**. Rio de Janeiro:MA- Serviço de Informação Agrícola, p.334, 1949.
- NETO, J.G.et al. Uso da Somatotropina Bovina em búfalas: Efeitos sobre a produção e composição do leite. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 6, n. 5, p. 1056-1071, 2009.
- NUNES, J. F. Biotécnicas aplicadas a reprodução de pequenos ruminantes. In: FILHO, R. M; MARTINS, J. A. M. **Biotecnologias aplicadas ao melhoramento genético animal**. Fortaleza: Tecnograf, Cap.1, 13-40 p, 2010.
- OLIVEIRA, M. E. F. ; TEIXEIRA, P. P. M. ; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**. 1 ed. São Paulo: MedVet, , p.305, 2013.
- OLIVEIRA, M. E. F. et al. **Ultrassonografia do Sistema Reprodutor Masculino de pequenos ruminantes**. São Paulo: MedVet, 1. ed., p.191, 2014.
- PACHECO, A. et al. Características seminais de carneiros da raça santa Inês na pré-puberdade, puberdade e na pós-puberdade. *Ars Veterinaria*. v. 25, n.2, p. 90-99, 2009.

PACHECO, A et al. Biometria e formas dos testículos em cordeiros da raça Santa Inês explorados em regime de manejo intensivo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v.5, n.1, p.123-128, 2010.

PEGG, D. E. The History and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive**, v. 20, n.1, p.05-14, 2002.

PÉREZ-PÉ, R. et al, T. Semen plasma proteins prevent coldshock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 425-434, 2001.

PETRUNKINA A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal Reproduktions Med Endokrinol**, v.4, p.78-91, 2007.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, n.3, p.215-225, 2006.

RABASSA, V. R. **Efeito** da Somatotropina Suína (pST) sobre o desenvolvimento testicular, idade à puberdade e qualidade espermática de machos suínos. 2012. 63f. **Tese** (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2012.

REECE, W.O. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. 351 p.

REECE W. O. DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12. Ed. Guanabara Koogan, 2007.

RITZEN, E. M. Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.19, n.1B, p.499 –504, 1983.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.312-318, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v.68, p.138-146, 2007.

SALAMON, S. Semen y sus características. In: **Inseminacion artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza, Espanha: Acribia, p.25-33, 1990.

SCHAMS, D. B. et al. Possibile role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, n. 2-3, p.279-285, 1999.

SHAMSI et al. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. **Mutation Research**. v.665, n.1-2, p.29-36, 2009.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n. 4, p.370-384, 2011.

- SIMPLICIO, A.A., SALLES, H.O., SANTOS, D.O. **Transferencia de embriões nos pequenos ruminantes domésticos**. In: Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal, v.1 p. 17-27, 2002.
- SIROTKIN, A. V. Control of reproductive processes by growth hormone: extra-and intracellular mechanisms. *Veterinary Journal*, v.170, n.3, p.307-317, 2004.
- SNOWDER, G. D. et al. Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. *Journal of Animal Science*, v.80, n.6, p.1508–1511, 2002.
- SNOECK, P. P. N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.
- SOARES et al. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutatona reduzida. *Ciência Rural*, v.41, n.11, p.1991-1997, 2011.
- SONG et al. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *International Journal of Andrology*, v.29, n.1, p.569-575, 2006.
- SOUZA, C. E. A. **Avaliação da função reprodutiva de carneiros santa Inês durante o primeiro ano de vida: estudo do desenvolvimento testicular, produção espermática e caracterização das proteínas do plasma seminal**. 2003, 160p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. 2003.
- SOUZA, F. A. et al. IGF-I, leptina, Insulina e proteínas associadas à qualidade do plasma seminal: ação local. *Revista de Medicina Veterinária*, v. 2. n. 20, p. 9-25, 2010.
- SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4 ed., 2006, 752p.
- SUMPTER, J. P. et al. Plasma growth hormone levels during sexual maturation in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *General and Comparative Endocrinology*. 83, 103–110, 1991.
- TENA-SEMPERE, M; BARREIRO, M. L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular And Cellular Endocrinology*, v.188, n. 1-2, p. 9-13, 2002.
- THOMAS, A. D. et al. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1531-1550, 2006.
- TILBURG, M. F. V. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 731-739, 2008.
- VALENTE, S.S.; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C. et al. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Animal Reproduction Science*, v.117, p.74-77, 2010.

VERSTEGEN, J et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Ano 4, N° 12, Porto Alegre, Março de 2008.

VIEIRA, M. B. et al. Effect of Recombinant Bovine Somatotropin on plasma concentrations of Insulin-like Growth Factor I, Insulin and Membrane Integrity of bull spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals**, V.45, n. 6, p. 1110-1113, 2010.

WATSON, P. F. The cause reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, n. 2, p. 481-492, 2000.

WAY, A. L et al. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.21, n. 2, p. 213-219, 2000.

WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. **Fertility and Sterility**, v.83, p.929-936, 2005.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization, Chapter 5. In: KNOBIL E., NEILL J. D. **The physiology of Reproduction**. Ed. Raven Press, LTDA, New York, p.189-317, 1994.

APÊNDICE

FIGURAS

CAPÍTULO I *

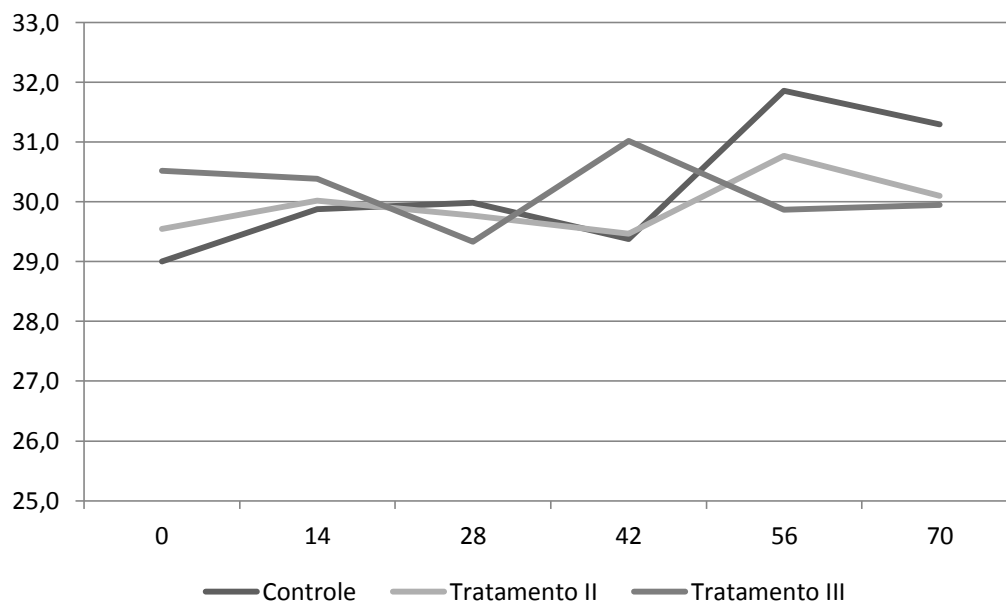


Figura 1. Circunferência escrotal dos carneiros Santa Inês, grupos controle (T-I) linha azul, tratamentos com 100mg/rbST (T-II) linha vermelha e 125mg/rbST (T-III) linha verde.

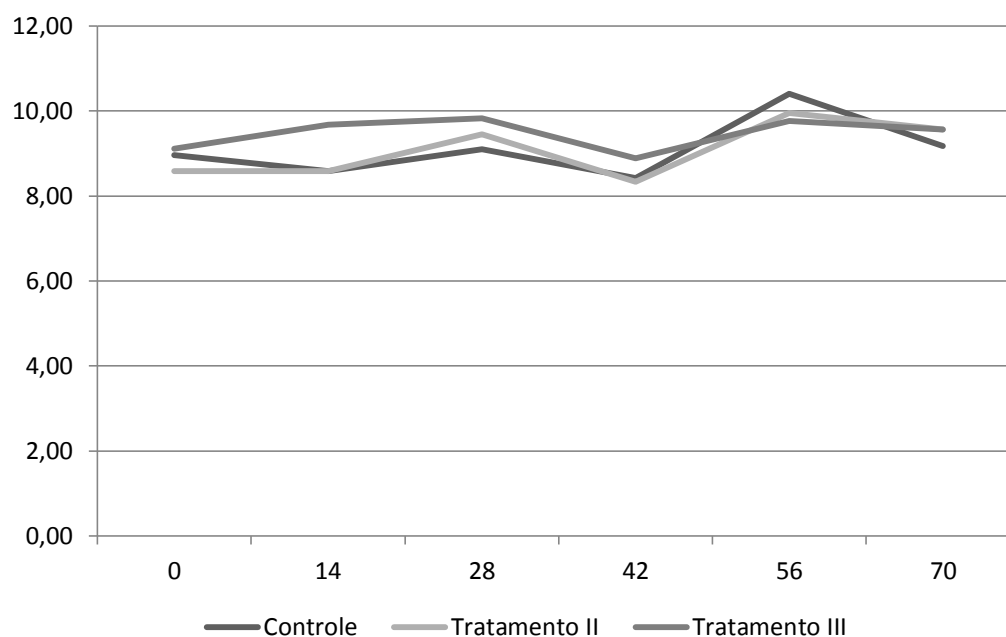


Figura 2. Medidas do comprimento do testículo direito (cm) dos grupos controle (T-I) linha azul, tratamentos com 100mg/rbST (T-II) linha vermelha e 125mg/rbST (T-III) linha verde, dos carneiros Santa Inês nas coletas dos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 70

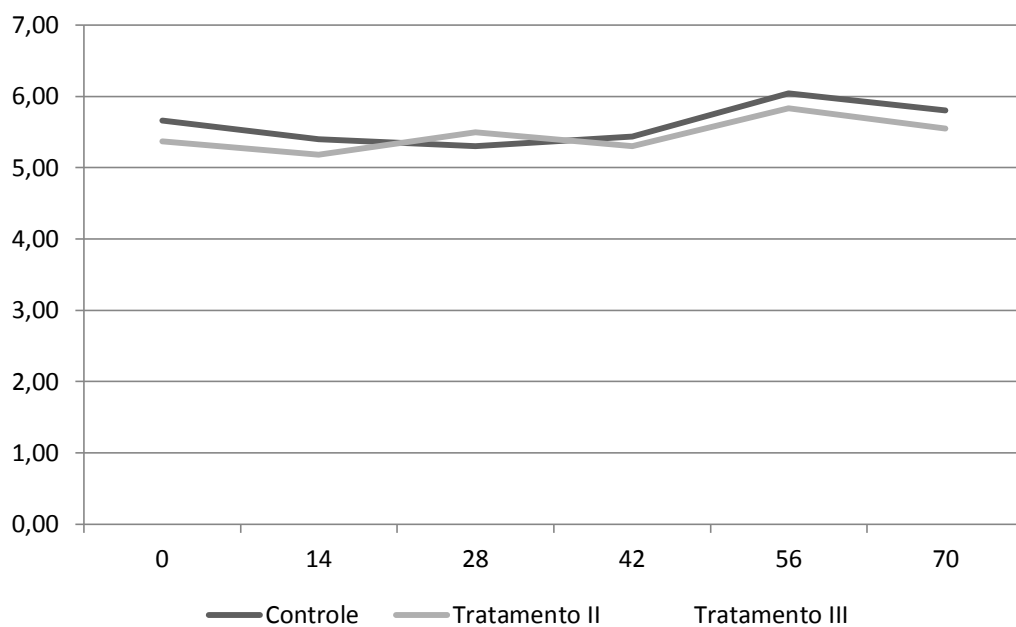


Figura 3. Medidas da Largura do testículo direito (cm) dos grupos controle (T-I) linha azul, tratamentos com 100mg/rbST (T-II) linha vermelha e 125mg/rbST (T-III) linha verde, dos carneiros Santa Inês nas coletas dos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 70.

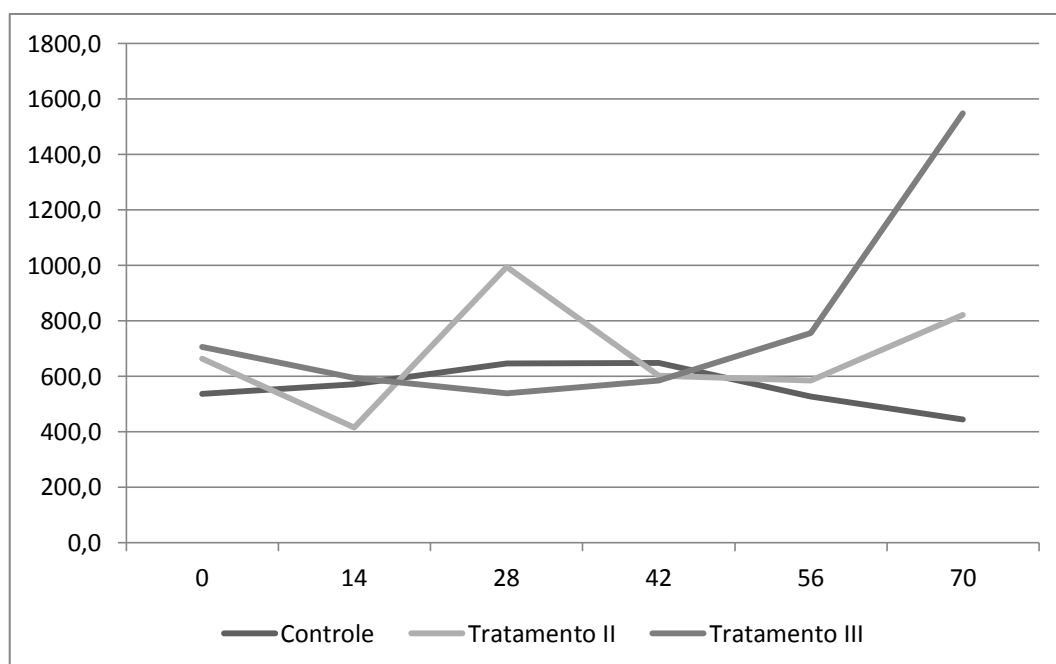


Figura 4. Concentração espermática (sptz/mm³) dos grupos controle (T-I) linha azul, tratamentos com 100mg/rbST (T-II) linha vermelha e 125mg/rbST (T-III) linha verde, dos carneiros Santa Inês nas coletas dos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 70.

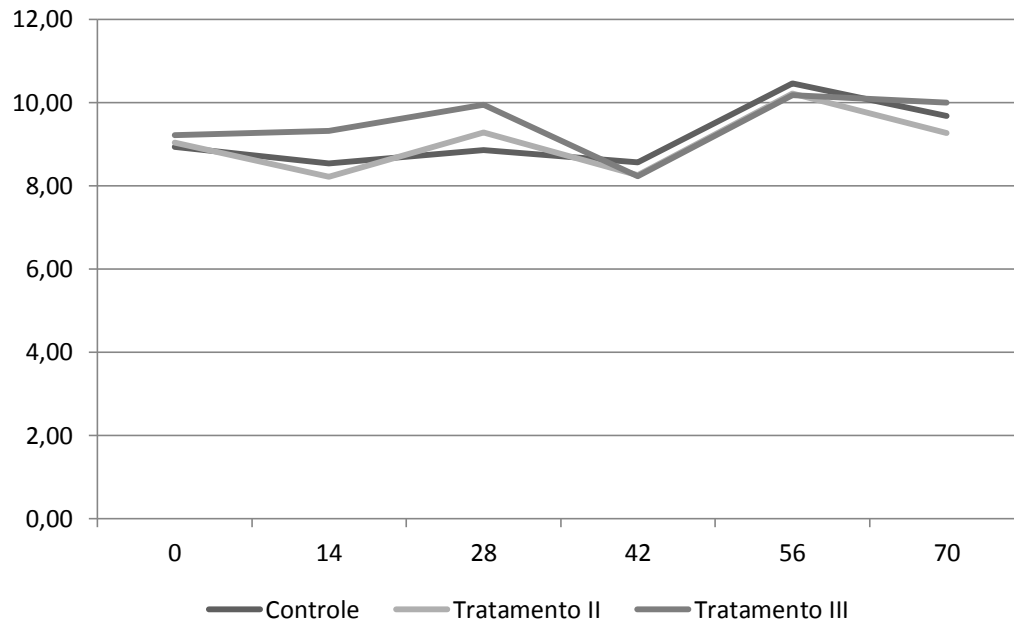


Figura 5. Medidas do comprimento do testículo esquerdo (cm) dos grupos controle (T-I) linha azul, tratamentos com 100mg/rbST (T-II) linha vermelha e 125mg/rbST (T-III) linha verde, dos carneiros Santa Inês nas coletas dos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 70.

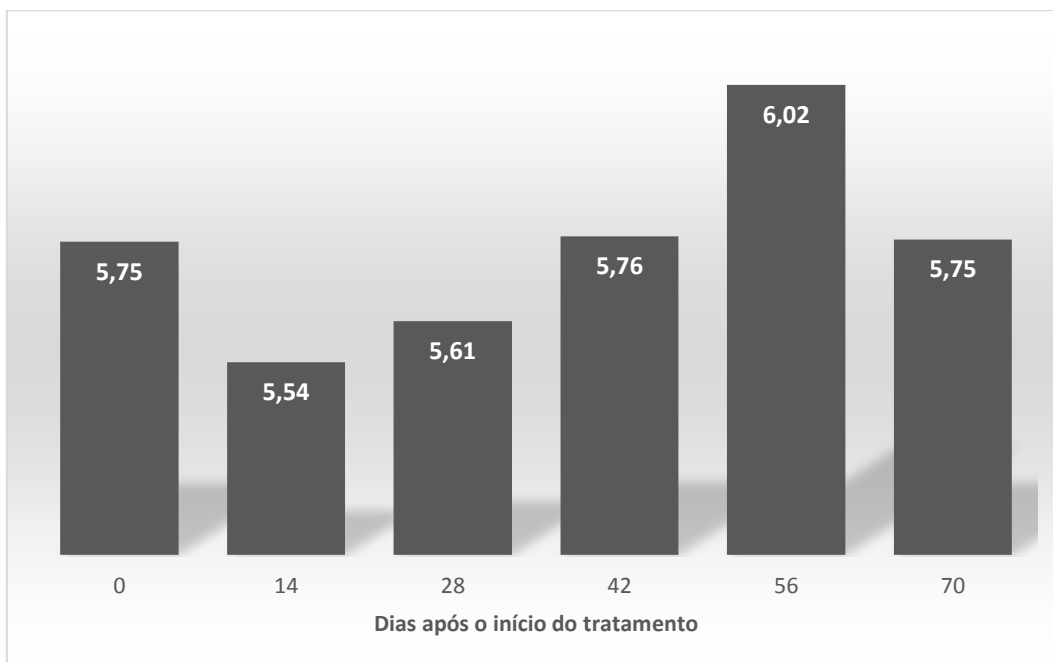


Figura 6. Medidas da Largura do testículo esquerdo (cm) dos carneiros Santa Inês interagindo com os dias de tratamento e coletas D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

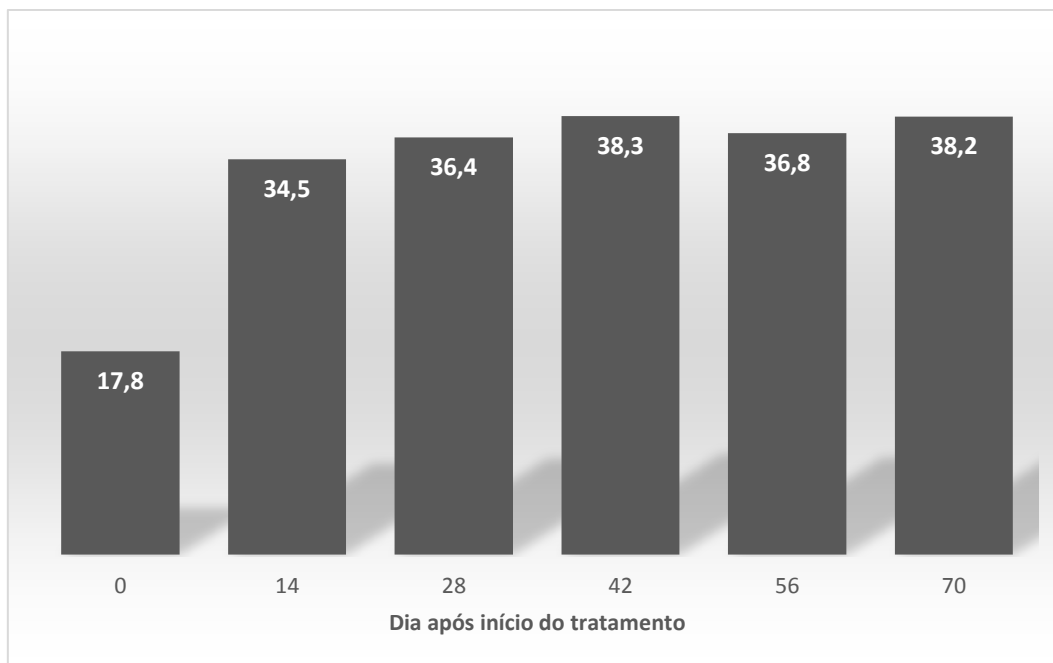


Figura 7. Comportamento sexual avaliando o tempo de monta (segundos) dos carneiros Santa Inês interagindo com os dias de tratamento e coletas D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

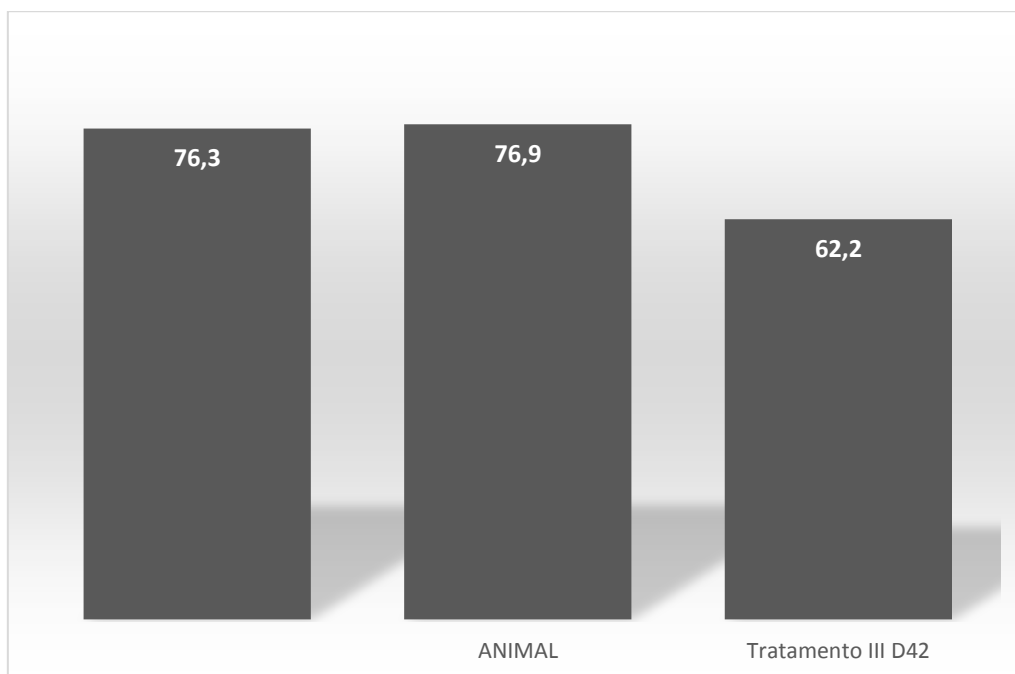


Figura 8. Motilidade Total (%) dos ejaculados dos grupos controle e tratados com 100mg/rbST (T-II) e 125mg/rbST (T-III) dos carneiros Santa Inês.

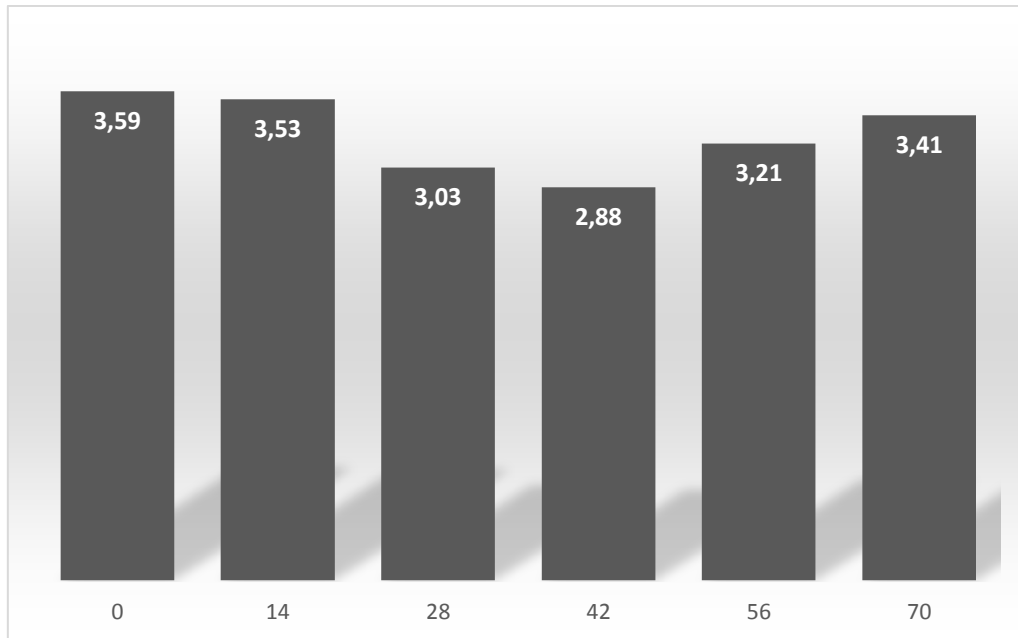


Figura 9. Vigor (0-5) dos ejaculados dos carneiros Santa Inês interagindo com os dias de tratamento e coletas D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

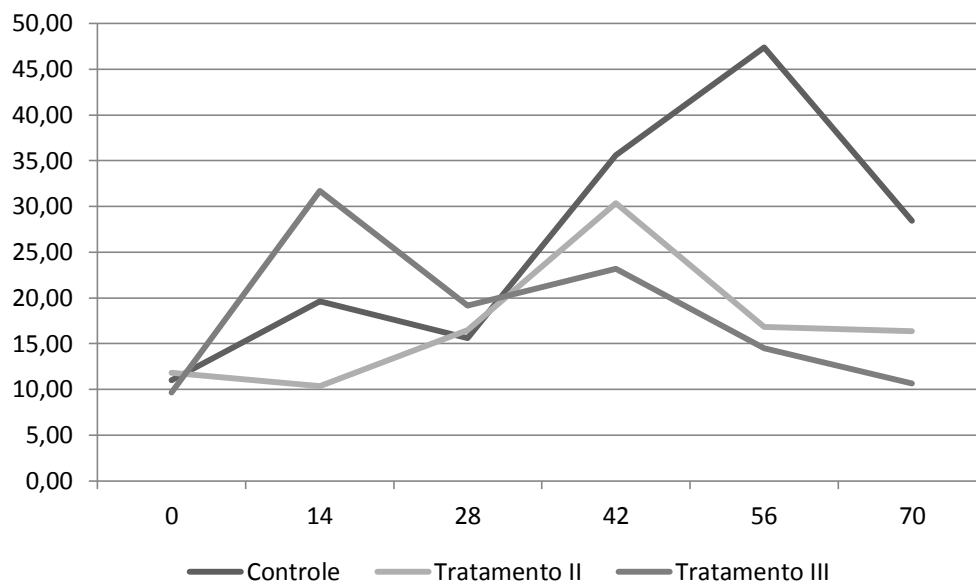


Figura 10. Morfologia espermática, defeitos maiores (DFM) dos grupos controle (T-I) linha azul, tratamentos com 100mg/rbST (T-II) linha vermelha e 125mg/rbST (T-III) linha verde, dos carneiros Santa Inês nas coletas dos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 70.

TABELAS

CAPÍTULO I *

Tabela 1. Médias da circunferência escrotal (cm) de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento		
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)
0	29,0 ^{Ca}	29,6 ^{Aa}	30,5 ^{Aa}
14	29,9 ^{ABCa}	30,0 ^{Aa}	30,4 ^{Aa}
28	30,0 ^{ABCa}	29,8 ^{Aa}	29,3 ^{Aa}
42	29,4 ^{BCa}	29,5 ^{Aa}	31,0 ^{Aa}
52	31,9 ^{Aa}	30,8 ^{Aa}	29,9 ^{Aa}
70	31,3 ^{Aba}	30,1 ^{Aa}	30,0 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey-Kramer

Tabela 2. Médias da consistência do testículo direito, escores (1 - 4), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento		
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)
0	3,0 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}
14	3,2 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}
28	3,0 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}
42	3,0 ^{Aa}	2,7 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}
56	3,2 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,3 ^{Aa}
70	3,4 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 3. Médias da consistência do testículo esquerdo, escores (1 - 4), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento		
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)
0	3,0 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}
14	3,2 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}
28	3,0 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}
42	3,0 ^{Aa}	2,7 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}
56	3,2 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,3 ^{Aa}
70	3,4 ^{Aa}	3,0 ^{Aa}	3,2 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 4. Médias do comprimento do testículo direito (cm), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento		
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)
0	8,96 ^{Ba}	8,58 ^{BCa}	9,12 ^{Aa}
14	8,58 ^{Ba}	8,58 ^{BCa}	9,68 ^{Aa}
28	9,10 ^{Ba}	9,45 ^{Aa}	9,83 ^{Aa}
42	8,42 ^{Ba}	8,33 ^{Ca}	8,88 ^{Aa}
56	10,40 ^{Aa}	9,95 ^{Aa}	9,77 ^{Aa}
70	9,18 ^{Aba}	9,57 ^{ABa}	9,57 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 5. Médias da largura do testículo direito (cm), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento		
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)
0	5,66 ^{Aa}	5,37 ^{Aa}	5,67 ^{Aba}
14	5,40 ^{Aa}	5,18 ^{Aa}	5,82 ^{Aba}
28	5,30 ^{Aa}	5,50 ^{Aa}	5,28 ^{Ba}
42	5,44 ^{Aa}	5,30 ^{Aa}	6,03 ^{Aa}
56	6,04 ^{Aa}	5,83 ^{Aa}	5,43 ^{Aba}
70	5,80 ^{Aa}	5,55 ^{Aa}	5,40 ^{Aba}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 6. Médias do comprimento do testículo esquerdo (cm), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento		
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)
0	8,94 ^{Aba}	9,03 ^{ABa}	9,22 ^{Aba}
14	8,54 ^{Ba}	8,22 ^{Ba}	9,32 ^{Aba}
28	8,86 ^{Ba}	9,28 ^{ABa}	9,95 ^{Aa}
42	8,56 ^{Ba}	8,25 ^{Ba}	8,23 ^{Ba}
56	10,46 ^{Aa}	10,22 ^{Aa}	10,18 ^{Aa}
70	9,68 ^{Aba}	9,27 ^{ABa}	10,00 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 7. Médias da largura do testículo esquerdo (cm), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento			
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)	Geral
0	5,64	5,57	6,03	5,75 ^{AB}
14	5,16	5,35	6,10	5,54 ^B
28	5,54	5,47	5,82	5,61 ^B
42	5,52	5,38	6,37	5,76 ^{AB}
56	5,98	5,88	6,20	6,02 ^A
70	5,92	5,43	5,90	5,75 ^{AB}
Geral	5,63 ^a	5,51 ^a	6,07 ^a	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 8. Médias do comportamento sexual (libido) pelo tempo de monta (segundos), de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento			
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)	Geral
0	17,2	15,8	20,2	17,8 ^B
14	28,2	37,5	36,8	34,5 ^A
28	30,6	48,2	29,5	36,4 ^A
42	31,2	56,8	25,7	38,3 ^A
56	23,0	63,5	21,7	36,8 ^A
70	42,4	30,2	42,8	38,2 ^A
Geral	28,8 ^a	42,0 ^a	29,4 ^a	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 9. Médias do volume seminal (mL) de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Tratamento				
Dia/Coleta	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)	Geral
0	1,10 ^a	1,08 ^a	1,00 ^a	1,06 ^a
14	0,76 ^a	0,77 ^a	0,98 ^a	0,84 ^a
28	1,00 ^a	0,95 ^a	1,07 ^a	1,01 ^a
42	1,08 ^a	0,93 ^a	0,95 ^a	0,98 ^a
56	0,72 ^a	0,85 ^a	1,05 ^a	0,88 ^a
70	0,62 ^a	0,97 ^a	1,00 ^a	0,88 ^a
Geral	0,88 ^a	0,93 ^a	1,01 ^a	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 10. Médias do turbilhonamento (0-5) de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Tratamento				
Dia/Coleta	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)	Geral
0	3,20 ^a	3,42 ^a	3,67 ^a	3,44 ^a
14	3,80 ^a	3,33 ^a	3,17 ^a	3,41 ^a
28	3,40 ^a	3,25 ^a	3,00 ^a	3,21 ^a
42	3,20 ^a	3,00 ^a	2,33 ^a	2,82 ^a
56	3,40 ^a	3,50 ^a	3,17 ^a	3,35 ^a
70	3,20 ^a	4,00 ^a	2,83 ^a	3,35 ^a
Geral	3,37 ^a	3,42 ^a	3,03 ^a	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 11. Médias do Vigor (0-5) de carneiros tratados ou não com somatotropina bovina recombinante (rbST) na pré-criopreservação.

Dia/Coleta	Tratamento			Geral
	T-I (Controle)	T-II (100mg/rbST)	T-III (125mg/rbST)	
0	3,90	3,75	3,17	3,59 ^A
14	3,90	3,42	3,33	3,53 ^A
28	3,20	3,08	2,83	3,03 ^B
42	3,20	3,00	2,50	2,88 ^B
56	3,20	3,42	3,00	3,21 ^{AB}
70	3,60	3,83	2,83	3,41 ^{AB}
Geral	3,50 ^a	3,42 ^a	2,94 ^a	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 12. Médias do perímetro escrotal (cm) de carneiros Santa Inês tratados ou não com rbST nos dias D0, 14, 28, 42, 56 e 70.

Datas/Coletas	Tratamentos		
	T-I (Controle) (n=6)	T-II (100mg/rbST) (n=6)	T-III (125mg/rbST) (n=6)
0	29,0 ^{Ca}	29,6 ^{Aa}	30,5 ^{Aa}
14	29,9 ^{ABCa}	30,0 ^{Aa}	30,4 ^{Aa}
28	30,0 ^{ABCa}	29,8 ^{Aa}	29,3 ^{Aa}
42	29,4 ^{BCa}	29,5 ^{Aa}	31,0 ^{Aa}
56	31,9 ^{Aa}	30,8 ^{Aa}	29,9 ^{Aa}
70	31,3 ^{Aba}	30,1 ^{Aa}	30,0 ^{Aa}

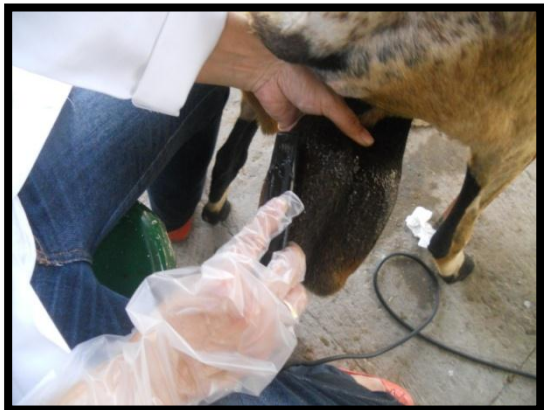
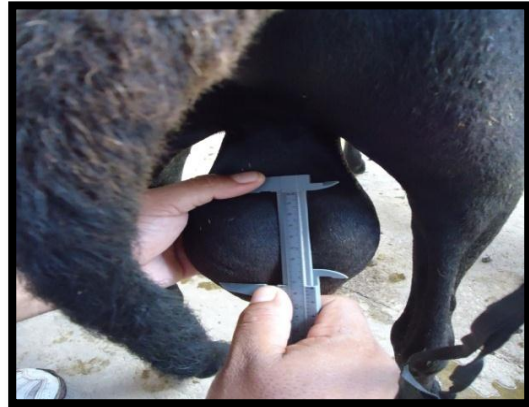
*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey-Kramer.

IMAGENS DAS ESTAPAS DO EXPERIMENTO

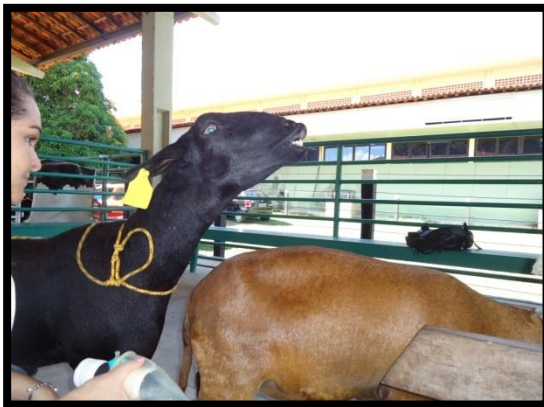
ANIMAIS E APLICAÇÃO DO HORMÔNIO rbST



BIOMETRIA E ULTRASSONOGRAFIA TESTICULAR



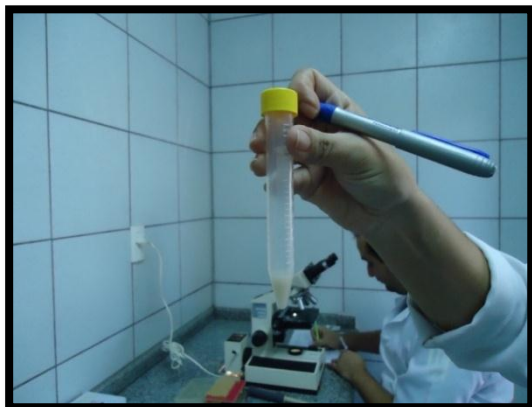
COMPORTAMENTO SEXUAL DOS ANIMAIS



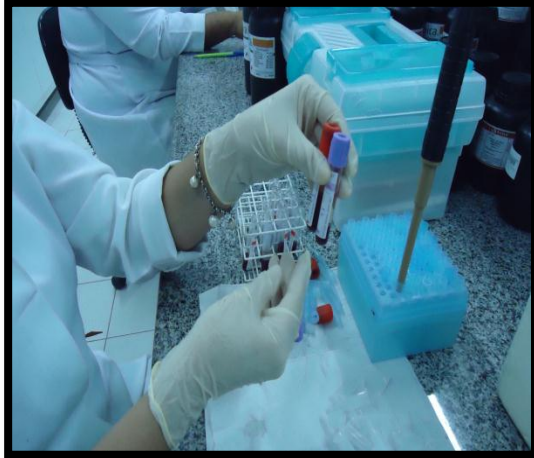
COLETA DE SEMEN



LOCAL, AVALIAÇÃO DO SEMEN



PROCESSAMENTO E ALIQUOTAGEM DO SANGUE E PLASMA SEMINAL



CRIOPRESERVAÇÃO DO SEMEN



AVALIAÇÃO MEDIATA DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA/PATOLOGIAS



ANEXO

FICHA DE CAMPO PARA ANDROLÓGICO

PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL / UFPI

DOUTORANDA LEOPOLDINA A. GOMES

ÁREA: SANIDADE E REPRODUÇÃO

PROPRIETARIO:			FAZENDA:		
ENDEREÇO:			DATA:		Nº da FOLHA:
Amostra					
Número					
Registro					
Nome					
Nasc/Idade					
Raça					
Peso(kg)					
Cond. Corporal					
CE(cm)					
Histórico					
Clinico Geral					
Aprumos					
Escroto					
Prepúcio					
Pênis					
Cordões Sperm					
Epidídimo Dir.					
Epidídimo Esq.					
Genitália Interna					
TD Consistência					
TE Consistência					
TD Comp. X Larg.					
TE Comp. X Larg.					
Método Coleta					
Volume (ml)					
Turbilhão (0-5)					
Motilidade (%)					
Vigor (0-5)					
Conc. (diluição)					
Observação					
Técnico responsável pela coleta:					
Observações:					



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

Teresina, 31 de Janeiro de 2014.

Ilmo.

Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA
Departamento: Clínica e Cirurgia Veterinária- CCA /UFPI

Senhor Pesquisador

Em reunião na presente data (31 de Janeiro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **006/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Efeito da Somatotropina bovina recombinante (rbst) na criopreservação de sêmen ovino Santa Inês**", sob a sua responsabilidade. Informamos que no projeto serão usados 13 Ovinos (12 machos e 01 fêmea). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof.ª Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora