

Novos conhecimentos relacionados a produção de sêmen e entendimento sobre a variação de resultados de prenhez a IATF devido efeito de touro

B. R. Harstine & M. L. Day

Department of Animal Sciences, The Ohio State University, 2027 Coffey Rd, Columbus, OH 43210, 614-292-6583 (office), day.5@osu.edu

Introdução

O uso de reprodução seletiva em bovinos, especialmente nos últimos 50 a 60 anos, permitiu aumento na produção de leite e carne pelas raças comumente usadas (Ruaw et al., 1998). Estes aumentos na eficiência produtiva coincidem com maior demanda por parte dos consumidores, população crescente e aumento dos custos de produção para os pecuaristas. As empresas de genética bovina (isto é, as empresas de IA) sabem das demandas dos produtores de bovinos, e se empenham em fornecer genética cada vez melhor. Os dois fatores principais que afetam o melhoramento genético são a capacidade de identificar animais ainda jovens de alto mérito genético e a capacidade física destes animais de fornecer material genético em termos de oócitos e espermatozóides. Com relação ao primeiro destes obstáculos, o uso de genômica para predizer a futura produtividade de um animal tornou-se cada vez mais comum. Usando a genômica, o valor genético de um touro pode ser calculado ou determinado muito antes que o touro alcance a maturidade sexual (Scheifers & Weigel, 2012; Humblot, 2010). Com relação à segunda barreira, os touros precisam atualmente alcançar a puberdade para poder transmitir seus genes (Blood & Studdert, 1999). Um aumento na produção de sêmen em fase mais precoce da vida produtiva de um reprodutor de destaque genômico permite que haja um acesso maior as estas genéticas superiores. A puberdade em touros tem sido uma área de interesse crescente há várias décadas, e vários métodos para apressar a puberdade foram tentados por outros grupos. Em anos recentes, o interesse de nosso laboratório em genética bovina, reprodução e fertilidade nos levou a pesquisar métodos para antecipar a puberdade em touros.

Por que o desejo recente de apressar a puberdade?

Antes do uso da genômica, o valor genético de um touro era inicialmente determinado pelo pedigree do animal e por características físicas individuais. As filhas de um touro eram avaliadas em termos de seu desempenho na produção de leite (gado leiteiro) e taxa de crescimento, peso ao nascer, etc. (gado de corte), fazendo com que o touro se tornasse mais ou menos atraente para os produtores. Atualmente, o uso de genômica está mudando o setor, acrescentando ferramentas poderosas para selecionar os touros que serão usados em IA. De acordo com Amann & DeJarnette (2012), está ocorrendo uma mudança de paradigma na área de genética de bovinos. A era genômica na reprodução de bovinos não mostra nenhum sinal de redução de sua implantação ou utilidade.

Devido à seleção genômica, as empresas de inseminação artificial adquirem touros mais jovens e querem vender sua genética o mais cedo possível. Assim, há tendência recente no sentido de coletar material dos touros o mais cedo possível para disseminar sua genética. A puberdade dos touros tornou-se uma área de grande interesse devido a mudanças relativamente recentes dentro da indústria de IA. Antes de apresentar o trabalho realizado por nosso laboratório e por outros, é interessante resumir as mudanças endócrinas e fisiológicas que ocorrem no touro pré-púbere, resultando na obtenção da espermatogênese.

Endocrinologia do touro pré-púbere

A endocrinologia está por trás de muitos processos fisiológicos que levam à puberdade nos machos. O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) controla grande parte da maturação pós-natal e a função pós-púbere subsequente do trato reprodutivo e espermatogênese

O hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) é sintetizado dentro do núcleo arqueado do hipotálamo e liberado de maneira pulsátil a partir de neurônios

específicos, liberadores de GnRH, no macho adulto. Os receptores de GnRH alvo estão em estreita proximidade, na hipófise anterior, e o GnRH secretado percorre o sistema porta-hipófise até os receptores (Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1989). O GnRH se liga aos receptores de gonadotropina na hipófise anterior, provocando a liberação de FSH e hormônio luteinizante (LH) (Campbell et al., 2009). Em animais na fase pós-natal, é necessário que haja uma “preparação” do hipotálamo e da hipófise (6 – 10 semanas de idade) antes que possa ocorrer a liberação de LH. Está estabelecido em bovinos que o aumento da secreção peri-púbere de LH é resultado não apenas da maior secreção de GnRH (Rodriguez & Wise, 1989), mas também por causa da queda no feedback negativo de estradiol sobre a secreção de GnRH e LH (Day & Anderson, 1998). É pouco provável que o estrógeno com origem na gônada bloqueie a secreção de LH da hipófise no touro pré-púbere antes de 10 semanas de idade, uma vez que a castração não induz ou aumenta a pulsatilidade do LH (Wise et al., 1987). Além disso, a hipófise pode ter reservas de LH pós-natal mas ser incapaz de responder ao GnRH antes de 10 semanas de idade devido à falta de receptores de GnRH (GnRH-R; Rodriguez & Wise, 1989). Coincidentemente, há aumento significativo (314%) no GnRH-R na hipófise anterior entre 6 – 10 semanas de idade e redução (70%) no estradiol-R no hipotálamo durante este mesmo período (Amann et al., 1986). Outros estudos sugerem que o estradiol que se origina localmente, via produção neuronal (McEwen, 1980; Dickson & Clark, 1981) e das suprarrenais (Henricks et al., 1988), pode atuar como bloqueio hormonal ao GnRH durante o estágio neonatal e no início da pré-puberdade.

Independente do controle pós-natal do LH, uma vez que a hipófise se torna responsiva ao GnRH, adquire a habilidade de secretar LH e FSH. Estudos relatam de forma consistente que há aumento passageiro no LH começando com 6 semanas de idade, que se estabiliza, permanecendo até aproximadamente 20 semanas de idade (Amann et al., 1986; Evans et al., 1995; Madgwick et al., 2008). A maioria dos autores atribui este aumento passageiro do LH a maior frequência de pulsos (McCarthy et al., 1979; Amann, 1983; Rawlings & Evans, 1995). É provável que a redução do LH com

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

aproximadamente 20 semanas seja causado por feedback negativo causado por níveis crescentes de andrógeno sendo produzidos pelos testículos (Bagu et al., 2006).

Na fase pós-natal, as concentrações de testosterona dos touros são baixas antes das 12 semanas de idade (Lacroix & Pelletier, 1979; Amann & Walker, 1983). A testosterona não apresenta aumentos acentuados até que haja elevação da gonadotropina e isto coincide com o que ocorre em outras espécies como carneiros (Wilson & Lapwood, 1979) e ratos (Kolho et al., 1987). A testosterona é sequestrada dentro dos testículos pela proteína de ligação de andrógeno (ABP), que também aumenta depois das 20 semanas de idade, levando a concentrações intra-testiculares de testosterona extremamente elevadas, necessárias para manter a espermatogênese (Dadoune & Demoulin, 1993; Gilula et al., 1976).

O FSH derivado da hipófise tem secreção pré-púbere similar à do LH. A maioria dos estudos aponta aumento passageiro iniciando com aproximadamente 4 semanas de idade que permanece até 25 semanas de idade (Evans et al., 1993; Rawlings & Evans, 1995; Aravindakshan et al., 2000; Bagu et al., 2006). O FSH é o hormônio enfocado por esta pesquisa por causa de sua ação proliferativa sobre as células de Sertoli, dentro dos túbulos seminíferos (Orth, 1984). Isto será discutido posteriormente com mais detalhes

Finalmente, inibinas e activinas regulam a produção e ação do FSH. A inibina é inicialmente detectável com 8 semanas de idade (MacDonald et al., 1991) e é produzida pelas células de Sertoli em resposta ao FSH da hipófise. Nota-se que a concentração de inibina começa a ter relação inversa aos níveis de FSH com início às 10 semanas de idade. As activinas, por outro lado, diferente das inibinas, tem uma gama de efeitos mais ampla no organismo. Acredita-se por exemplo, que as activinas desempenham importante papel no desenvolvimento embrionário e no estabelecimento do funcionamento reprodutivo (Matzuk et al., 1995). Em machos normais, a activina neutraliza a inibina estimulando a secreção de FSH da hipófise, tanto a basal como a induzida por GnRH (de Kretser & Phillips, 1998). Os machos apresentam seus níveis circulantes de activina mais elevados depois do nascimento (Barakat et al., 2008), mas estas concentrações elevadas diminuem em torno do momento em que as

gonadotropinas com elevação passageira começam a ter reduzida a sua concentração com 20 semanas de idade (Buzzard et al., 2004).

Mudança da fisiologia testicular do touro pré-púbere

A alteração do ambiente hormonal mencionada acima desempenha papel essencial no estabelecimento do ambiente testicular, necessário para a espermatogênese. A definição geral de puberdade para touros foi estabelecida por Wolf & Lunstra nos anos 1980. A chegada da puberdade nos touros é marcada usando dois critérios: o primeiro sendo a capacidade do animal de produzir um ejaculado contendo 50 milhões de espermatozóides com 10% de motilidade, e o segundo quando a circunferência escrotal alcança 28 centímetros (SC; Wolf et al., 1965; Lunstra, 1982). Muitas vezes, esta circunferência escrotal precede a capacidade do animal de produzir a quantidade necessária de espermatozóides (Wolf et al., 1965).

Com relação a LH e testosterona e seus efeitos sobre o desenvolvimento das células de Leydig, os testículos iniciam um período de crescimento rápido com 20 semanas de idade ou logo depois (Amann & Walker, 1983; Bagu et al., 2006). É bastante provável por causa do aumento anterior, passageiro, no LH de 4 a 25 semanas de idade, que tem efeito proliferativo e de maturação sobre as células de Leydig no interstício testicular (Curtis & Amann, 1981). As células de Leydig derivam das células tronco mesenquimais que migraram para o interstício, e se considera que o hormônio tireoideo seja um dos principais fatores que causam a diferenciação de células mesenquimais em células progenitoras e depois em células de Leydig (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001).

Durante o desenvolvimento, a interação entre as células de Leydig, testosterona e LH é dinâmica. A concentração de LH-R nas células de Leydig aumenta no momento do nascimento de machos, e as concentrações estão provavelmente próximas do nível mais elevado ao nascimento ou logo depois (Purvis et al., 1997; Hardy et al., 1990;

Bagu et al., 2006). A concentração de LH-R diminui entre 13 e 21 semanas de idade uma vez que as células de Leydig progenitoras e fetais sofrem diferenciação. Ainda que o número de LH-R esteja diminuindo, sua afinidade pelo receptor (LH) é mantida do nascimento até durante a puberdade. Isto é crucial para permitir que as células de Leydig iniciem a produção de testosterona em resposta ao LH, começando com 28 semanas de idade (Bagu et al., 2006). Depois disso, as células de Leydig adquirem a função adulta e servirão como a principal fonte de andrógenos no macho adulto.

As células de Sertoli que revestem os túbulos seminíferos são responsáveis pela manutenção da maturação das espermatogônias para espermátides alongadas. Especificamente, regulam o entorno bioquímico das células germinativas porque envolvem as células, formando assim um ambiente separado dentro dos túbulos seminíferos (Griswold, 1998). As células de Sertoli ajudam a produção de espermatozóides, mantendo ao mesmo tempo altas concentrações de testosterona dentro dos túbulos por meio da produção de ABP e a formação da barreira hematotesticular (Gilula et al., 1976).

Na fase após o nascimento, as células de Sertoli são muitas vezes denominadas “indiferenciadas” (Bagu et al., 2006; Amann, 1983). Estas células de Sertoli iniciais, que migraram do mesonefro para o testículo (Skinner & Griswold, 2005), são indiferenciadas no sentido de não estarem localizadas em uma posição específica dentro do túbulo, não formaram a barreira hematotesticular e ainda não têm uma relação proximal com as células germinativas em desenvolvimento. Estas células iniciais têm FSH-R, mas a concentração de receptor FSH-R por mg de tecido testicular diminui rapidamente depois do nascimento até 8 semanas de idade (Dias & Reeves, 1982). A concentração de FSH-R pode diminuir ligeiramente depois de 8 semanas de idade até 25 semanas de idade (Bagu et al., 2006) ou permanecer relativamente inalterada (Dias & Reeves, 1982). É importante lembrar que a afinidade do receptor pelo ligando FSH é uniforme, independente da concentração de FSH durante o período pré-púbere (Bagu et al., 2006), que é crucial porque as células de Sertoli precisam permanecer sensíveis ao FSH uma vez que se inicia a espermatogênese (Orth, 1984). A transição de células indiferenciadas para células de Sertoli é rápida, ocorre entre 13

e 25 semanas de idade, com rápido crescimento testicular depois disso (Bagu et al., 2006; Amann, 1983).

O FSH derivado da hipófise, que exerce seus efeitos sobre as células germinativas em desenvolvimento através do FSH-R nas células de Sertoli (Senger, 1997), é um foco importante para a pesquisa proposta. Há alterações temporais na produção de FSH nos touros durante o período pré-púbere. Há principalmente um aumento temporário no FSH, começando com 4 semanas de idade e que perdura até aproximadamente 25 semanas de idade (Evans et al., 1993; Rawlings & Evans, 1995; Aravindakshan et al., 2000; Bagu et al., 2006). Durante este aumento temporário de FSH, as células de Sertoli também passam por muitas proliferações sob os efeitos de estimulação do FSH até alcançarem seus números finais na população adulta (Orth, 1984). No touro, o número de espermatozóides/células germinativas que cada célula de Sertoli 'hospeda' é fixo (Curtis & Amann, 1981; Hochereau-de Reviers et al., 1987). Este fenômeno também é observado no homem mas não em espécies de reprodução sazonal, como o hamster e o garanhão (Blanchard & Johnson, 1997; Leal et al., 2004). Além disso, a capacidade das células de Sertoli de replicar sob os efeitos de estimulação de FSH é perdida na fase adulta (Sharpe et al., 2003). Por isso, o número de células de Sertoli presentes quando a puberdade é alcançada pode ser correlacionado com a produção adulta de espermatozóides. À medida que os testículos se equipam para a espermatogênese, as concentrações de activina e FSH diminuem. Isto coincide com o final da proliferação das células de Sertoli e pode indicar os dois principais fatores que regulam o aumento pós-natal do número de células de Sertoli (Buzzard et al., 2004).

Início da Espermatogênese

A combinação entre as mudanças endócrinas e o desenvolvimento fisiológico culmina com a capacidade do touro de produzir e ejacular espermatozóides viáveis. Os estágios iniciais da espermatogênese começam uma vez que a espermatogônia ocupa os espaços ao longo da membrana basal dos túbulos seminíferos, e isto pode ser

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

visualizado nos cortes histológicos de testículo, começando no touro entre 3 e 4 meses de idade (Chandolia et al., 1997a). Os espermatócitos podem ser vistos aos 6 meses de idade e as espermátides alongadas aos 8 meses de idade (Chandolia et al., 1997a; Barth, 2004). As ejaculações iniciais podem ter anomalias visuais se a puberdade não tiver sido finalizada, uma vez que os componentes testiculares necessários para a maturação dos espermatozóides (isto é, o epidídimo) podem não estar totalmente desenvolvidos (Evans et al., 1995). Estas anomalias podem incluir a presença de gotículas proximais ou comprometimento da motilidade, mas há acentuada diminuição destas anomalias logo antes da puberdade (Evans et al., 1995). A redução das anomalias visíveis dos espermatozóides coincide com a chegada à puberdade, uma vez que as concentrações de testosterona na gônada estão aumentando e sabemos que são importantes para a maturação dos espermatozóides no epidídimo (Martig & Almquist, 1969).

Os testículos passam por um crescimento rápido entre 25 e 28 semanas de idade (Lunstra et al., 1978), e isto pode ser atribuído em grande parte às mudanças nas funções individuais e números das células somáticas e germinativas (Bagu et al., 2004). Como um todo, a composição do testículo muda com o rápido desenvolvimento dos túbulos seminíferos e seu preenchimento por tipos de células espermatozóides de maturidade variável. De 12 a 32 semanas de idade, aumenta a porcentagem do testículo formado por túbulos seminíferos aumenta de 44 para 81% (Curtis & Amann, 1981), e o tamanho dos testículos continua aumentando, alcançando 90% do seu tamanho final aos 24 meses de idade (Coulter, 1986).

As glândulas sexuais acessórias precisam desenvolver-se em sincronia com as gônadas, e as glândulas vesiculares e a próstata começam a aumentar de tamanho rapidamente depois das 34 semanas de idade (Chandolia et al., 1997b). A empresa Select Sires, Inc. inicia as tentativas de coleta de sêmen em touros com 40 semanas de idade ou com 28 a 30 cm de circunferência escrotal para alguns touros altamente genômicos. Poucos touros irão montar um rufião com esta idade mas, com o passar do tempo, a maioria adquire a capacidade de montar e ejacular em uma vagina artificial em torno dos 12 meses de idade. Estima-se que 95% dos touros adquiriram a

capacidade de montar e ejacular sêmen de qualidade aceitável em torno de 12 – 13 meses de idade (correspondência pessoal, Mel DeJarnette). O número de espermatozóides por coleta também continua a aumentar durante o ano inicial de coleta, e a maioria dos touros alcançam um pico de produção de sêmen em torno dos 48 meses de idade (correspondência pessoal, Don Monke).

Intervenções para acelerar a puberdade em bovinos

Os touros de empresas de IA não produzem receita até que sejam capazes de produzir sêmen como produto comercializável. Para reduzir a perda associada ao tempo anterior à puberdade – e potencialmente elevar a receita uma vez alcançada maturidade – vários tipos de intervenções foram testados experimentalmente, na esperança de apressar a puberdade, aumentando a produção de espermatozóides maduros ou ambos. Foram realizados experimentos em diversas espécies de mamíferos, e alguns mostraram resultados promissores em humanos com transtornos do desenvolvimento sexual. Em geral, as intervenções caem em uma de três amplas categorias: aumentar as concentrações de gonadotropina por meio de terapia com gonadotropina exógena, aumentar as concentrações de gonadotropina bloqueando imunologicamente seus respectivos inibidores e/ou intervenções na dieta.

Começando pela adição de gonadotropina exógena, GnRH, FSH e LH foram extensamente estudados. Madgwick et al. (2008) trataram touros pré-púberes com 120 ng/kg GnRH duas vezes por dia de 4 até 8 semanas de idade. Os touros apresentaram um pulso de LH depois de cada injeção, e os touros que receberam GnRH tiveram um crescimento testicular mais rápido de 22 a 44 semanas de idade, e a puberdade foi antecipada em 6 semanas em relação aos controles. A antecipação da puberdade foi atribuída ao aumento do LH precoce, temporário, induzido, que normalmente se inicia com 6 semanas de idade. De maneira similar, Chandolia et al. (1997c) trataram touros com 200 ng de hormônio liberador de LH (GnRH) por via intravenosa, a cada 2 horas

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

durante 14 dias, de 4 a 6 semanas de idade, e relataram que níveis mais elevados de GnRH em touros pré-púberes causa aumento na secreção de LH e FSH.

Aparentemente, isto causou efeitos positivos permanentes sobre a função testicular, aumentando o número de células de Sertoli e células germinativas dentro dos testículos.

Devido principalmente aos seus efeitos proliferativos sobre as células de Sertoli, o FSH tornou-se popular nos estudos. Uma semana de idade é o mais cedo que as concentrações de FSH foram experimentalmente alteradas em touros (Kaneko et al., 2001). Bagu et al. (2004) trataram touros de 4 a 8 semanas de idade com FSH exógeno (10 mg NIH-FSH-S1 equivalente) em dias alternados, o que resultou em aumento temporário nas concentrações sistêmicas de FSH. Neste estudo, a puberdade foi antecipada e a avaliação histológica dos testículos feita com 56 semanas de idade revelou que os touros tratados com FSH tinham número maior de células de Sertoli, espermatídes alongadas e espermatócitos. Myers et al. (1983) administraram 5 mg FSH aos touros duas vezes por dia (10 mg/dia) durante 10 dias iniciando-se aos 4 meses de idade. Isto foi repetido em dois grupos de animais, um no verão e o outro no inverno. Estranhamente, os animais tratados no inverno não apresentaram alterações fisiológicas detectáveis, enquanto que o grupo tratado no verão respondeu com aumento (38%) no peso testicular e na concentração intratesticular de testosterona. Em ratos, as imunizações com FSH em diferentes idades precoces na fase pós-natal resultaram de forma constante em redução na proliferação de células de Sertoli e maior apoptose das células germinativas (Meachem et al., 2005). De maneira similar, o tratamento com antagonistas GnRH (supressão de FSH) causa redução de 45 – 52% no número de células de Sertoli e redução de 46% na massa testicular (Atanassova et al., 1999). Ainda em ratos, o tratamento pós-natal com FSH recombinante (adição de FSH) pode aumentar o número de células de Sertoli adultas em até 149% e causando hipertrofia testicular de até 124% (Meachem et al., 1996). Finalmente, no homem o tratamento com gonadotropina é comum em meninos diagnosticados com hipogonadismo hipogonadotrófico. Estes pacientes não produzem FSH e correm o risco de ter baixo crescimento do testículo e comprometimento da espermatogênese.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Em um estudo, meninos receberam injeções de FSH (r-hFSH, 1,5UI/kg) três vezes por semana em algum momento entre 2 a 34 meses *antes* da puberdade (induzida pelo esquema com hCG). O tratamento com FSH induz o crescimento testicular pré-púbere, aumenta inibina beta e permite que a maioria dos participantes do estudo, ao final do tratamento, ejaculem espermatozóides com motilidade (Raivio et al., 2007). Esta lista de estudos demonstra o efeito de adicionar (ou, em alguns casos, suprimir) gonadotropinas exógenas em animais pré-púberes. Outra abordagem para aumentar as concentrações de FSH envolve a remoção de seus principais inibidores, como destacado nos experimentos a seguir.

Foram realizadas diversas manipulações imunológicas em modelos com roedores e progrediram para estudos com animais de produção. Um destes estudos abrangentes em ratos usou imunização pós-púbere contra GnRH e interrompeu de forma eficaz a função do testículo na fase adulta (McLachlan et al., 1995). Estes ratos tratados são deficientes na produção de FSH, LH, testosterona e inibina, e são um excelente modelo para estudar os efeitos independentes de cada hormônio usando estudos de reposição. Em ratos imunizados com GnRH, a administração de rFSH durante 7, 14 ou 21 dias depois de cessada a espermatogênese causou, de forma consistente, aumentos de até 43% no peso dos testículos que acompanha aumento no volume dos túbulos seminíferos e a proporção do testículo formado por interstício. Além disso, a suplementação com rFSH resulta a retomada da espermatogênese até o estágio de espermátides redondas, bem como a restauração da concentração sérica de inibina, voltando ao normal. No entanto, as concentrações séricas ou testiculares de andrógeno não foram restauradas pelo tratamento com rFSH. Este tratamento mostra a capacidade de FSH de manter a espermatogênese até o estágio de espermátides redondas, mas esta progressão é reveladora porque a testosterona estava ausente deste sistema. Foi observado ainda pelos autores que a testosterona provavelmente seja o fator crucial, ausente, para que ocorra a espermatogênese normal (McLachlan et al., 1995). O principal alvo para a manipulação imunológica em touros tem sido a inibina. Os estudos iniciais imunizando touros contra inibina aos 6 meses de idade relataram aumento nas concentrações de FSH, mas não foi estabelecida uma relação

entre as imunizações contra inibina em uma fase inicial da vida e a produção de espermatozóides e concentrações de formas maduras (Kaneko et al., 1993). Estudos subsequentes (Kaneko et al., 2001; Bame et al., 1999; Martin et al., 1991) imunizaram touros contra inibina com baixa idade pós-natal com reforços sendo administrados periodicamente depois disso. Todos os estudos demonstraram que a imunização contra inibina eleva as concentrações séricas/plasmáticas de FSH. Um estudo realizado a seguir, utilizando os touros do estudo de Martin et al. (1991), mostrou que as imunizações aumentaram o número de espermátides alongadas por grama de tecido testicular (Lunstra et al., 1993). Ainda que não tenha consistência, a remoção dos inibidores de gonadotropina usando métodos imunológicos evita a via mais direta de administrar diretamente as gonadotropinas.

O uso da dieta para regular o início da puberdade geralmente afeta a endocrinologia associada ao processo. As manipulações da dieta de novilhas na fase pré-púbere estão bem documentadas. Gasser et al. (2006a, b, c, d), por exemplo, demonstraram que o desmame precoce de novilhas de corte *Bos taurus* e a utilização de dieta com alto teor de concentrado podem antecipar a puberdade em 3 a 4 meses. São menos comuns os estudos em touros, principalmente os destinados para uso em IA, examinando os efeitos da nutrição na fase pré-púbere. Foi demonstrado que limitar a nutrição durante a maturação sexual retarda a puberdade nos touros (Flipse & Almquist, 1961; Pruitt et al., 1986), resulta em testículos menores (VanDemark & Mager, 1964), reduz a circunferência escrotal (Pruitt et al., 1986), reduz a testosterona intratesticular (Mann et al., 1967) e reduz o número total de espermatozóides dos ejaculados de menor volume (VanDemark et al., 1964). Um estudo recente, realizado por Dance et al. (2015), utilizando dietas de alto teor energético em touros Holandeses, relatou que a utilização de uma dieta rica em energia de 2 a 31 semanas de idade resultou em antecipação da puberdade, testículos maiores, elevação precoce substancial no nível de LH e aumento das concentrações de IGF-1. De forma similar, o nosso laboratório (Harstine et al., 2015) alimentou touros Holandeses com dieta de alto teor de energia de 58 até 230 dias de idade. Os touros apresentaram circunferência escrotal maior, elevação mais precoce da pulsatilidade de LH, aumento da

concentração de testosterona e maior peso e volume testicular. No geral, os efeitos da nutrição, particularmente usando dieta rica em energia para aumentar o GMD na fase pré-púbere, fazem com que a puberdade seja antecipada. Muitas vezes, as dietas ricas em energia podem acelerar a função do eixo HHG e, desta forma, levar à antecipação da puberdade.

Efeitos da energia da dieta sobre a maturação sexual e produção de espermatozóides em touros Holandeses

O nosso laboratório realizou diversos estudos em novilhas, demonstrando que a puberdade pode ser induzida precocemente com dietas de alto teor energético, que ativam os mecanismos endócrinos relacionados a alcançar a puberdade, como maior frequência de pulsos de LH de maior intensidade (Gasser et al., 2006a,b,c,d). Em touros, a elevação precoce de gonadotropina também pode ser afetada pela dieta. Iniciar a administração de dietas com alto teor de energia com 10 semanas de idade pode resultar em testículos maiores, maior circunferência escrotal e maior produção diária total de espermatozóides em comparação com touros arraçoados com dietas controle (Brito et al., 2007). Também foi demonstrado recentemente que touros Holandeses recebendo dietas de alto teor energético de 2 a 31 semanas de idade tiveram antecipação da puberdade e aumento na frequência de pulsos LH de maior magnitude com idade mais baixa (Dance et al., 2015).

A nossa hipótese é que alimentar os touros com dieta rica em energia, a partir de 8 semanas de idade, anteciparia e aumentaria a elevação de LH na fase pré-púbere, resultando na antecipação da maturação dos testículos e da puberdade. Assim, o objetivo do nosso experimento foi avaliar o efeito da dieta rica em energia quando administrada no início da vida sobre o aumento inicial temporário na secreção de LH, as concentrações de testosterona, circunferência escrotal, idade à puberdade,

produção de espermatozóides maduros e características de testículos maduros em touros Holandeses.

Para resumir os métodos experimentais, quinze touros Holandeses foram criados com o mesmo programa nutricional formulado para novilhas leiteiras de reposição, que recebiam 1,9 litros de sucedâneo do leite duas vezes por dia até atingirem 50 dias de idade. Os touros foram desmamados com 50 dias de idade, transferidos para o The OSU Beef and Sheep Center, onde tiveram um período de adaptação de 7 dias antes de serem randomizados por idade, peso corporal e pedigree para um dos dois tratamentos. O grupo controle (CONT, $n = 7$) recebeu uma dieta formulada para um ganho médio diário de 0,75 kg/dia, e o grupo tratado com alto nível de energia (HE, $n = 8$) recebeu uma dieta formulada para um ganho médio diário de 1,5 kg/dia. As duas dietas eram isonitrogenadas (18,2% de proteína bruta), mas o consumo de energia era diferente (Tabela 1). As dietas foram dadas ao nível de 2,5% do peso corporal, que foi medido a cada duas semanas. Aos 230 dias de idade, os touros foram transportados para Select Sires Incorporated, onde todos receberam a mesma ração, formulada à base de silagem de milho e feno TMR.

Com relação à coleta de dados, o peso corporal e a circunferência escrotal foram medidos a cada 30 dias, aproximadamente. Para a análise de hormônios no sangue, o soro para medir LH foi coletado em intervalos de 10 minutos durante 8 horas aos 69, 97, 125, 156, 181 e 210 dias de idade, em um subconjunto de seis touros de cada tratamento. Nos mesmos dias, amostras de sangue para obtenção de plasma foram também coletadas a cada hora, para medir a concentração de testosterona. Para determinar quando ocorreu a puberdade, as tentativas para fazer a coleta dos touros por técnicos treinados da Select Sires foram iniciadas aos 241 dias de idade. As coletas foram tentadas a cada 14 dias usando um rufião, duas montas falsas e uma vagina artificial. O sêmen de dois ejaculados consecutivos foi analisado e a puberdade foi definida como o dia em que o touro foi capaz de ejacular mais de 50 milhões de espermatozoides com pelo menos 10% de motilidade progressiva (Wolf et al., 1965). Os touros foram removidos da coleta de sêmen quando alcançavam a puberdade, sendo que o último touro alcançou a puberdade aos 396 dias de idade. A seguir, a

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

produção de espermatozóides foi avaliada três vezes por semana quando os touros tinham de 552 a 569 dias de idade, usando a mesma técnica de coleta descrita anteriormente. A produção de espermatozóides maduros foi determinada usando coletas dos últimos seis dias de coleta.

Para examinar o efeito dos tratamentos envolvendo a dieta sobre o tamanho e a histologia testicular, os touros foram sacrificados com 569 dias de idade e seus testículos coletados. O epidídimo e o plexo pampiniforme foram retirados e o volume e o peso de cada testículo foram determinados. Cortes histológicos de cada testículo foram fixados para a posterior análise imunohistoquímica do diâmetro dos túbulos seminíferos e a porcentagem do testículo composto por túbulos seminíferos.

Durante a administração das dietas experimentais (antes de serem transportados para Select Sires), o ganho médio diário (GMD) foi de $1,51 \pm 0,14$ kg/d para os touros do grupo HE, que foi diferente do GMD de $1,00 \pm 0,15$ kg/d no tratamento CONT ($P < 0,01$). Depois de serem transferidos para Select Sires e o uso de uma dieta comum, o GMD foi $0,87 \pm 0,16$ kg/d para os touros HE, menos do que o GMD do tratamento CONT, $1,16 \pm 0,1$ kg/d ($P < 0,05$). Apesar da acentuada mudança no GMD entre os tratamentos, uma vez que os touros estavam na Select Sires, o peso corporal permaneceu maior ($P < 0,05$) no grupo HE do que no CONT até os 360 dias de idade (Figura 1).

Um importante achado do estudo foi que a dieta HE causou aumento mais intenso e prolongado na frequência de pulso de LH (Figura 2). As concentrações de testosterona foram maiores no grupo HE do que no CONT aos 181 e 210 dias de idade. A circunferência escrotal aumentou ao longo do tempo nos dois tratamentos, ainda que a taxas diferentes, e aos 146 d de idade (e depois até 360 d de idade), a circunferência escrotal foi maior no grupo HE do que no CONT. A idade à puberdade não foi diferente entre os touros HE ($323,3 \pm 11,5$ d de idade) e CONT ($301,9 \pm 13,0$ d de idade), nem o número de coletas necessárias antes de serem produzidos 50 milhões de espermatozóides entre os touros HE ($16,3 \pm 6,7$ coletas) e CONT ($14,1 \pm 3,0$ coletas). A produção diária de espermatozóides maduros também não foi diferente entre os tratamentos HE ($6,5 \pm 0,7$ bilhões de células espermáticas/d) e CONT ($6,1 \pm$

0,8 bilhões de células espermáticas /d). Ao abate (569 d de idade), o peso do testículo, o peso do epidídimo e o volume do testículo foram maiores no tratamento HE do que no CONT (Tabela 2). A porcentagem do testículo formado por túbulos seminíferos e o diâmetro médio dos túbulos seminíferos, no entanto, não foram diferentes entre os tratamentos HE e CONT (Tabela 2).

Os resultados deste estudo demonstram não apenas a necessidade de uma nutrição adequada no início da vida dos touros destinados a serem utilizados em IA, mostrando ainda a possibilidade de usar uma dieta de alto teor de energia para intensificar o crescimento testicular de touros. No entanto, os efeitos positivos da dieta rica em energia não se traduziram em puberdade mais precoce neste estudo e isto pode ser devido a redução do ganho de peso dos touros HE depois de sua mudança para Select Sires. Os efeitos positivos sobre a endocrinologia dos touros HE, especialmente sua secreção de LH em comparação com os controles, foram similares aos resultados do recente estudo de Dance et al. (2015).

Desenvolvimento e implementação de um tratamento de liberação lenta de FSH em touros pré-púberes

Buscamos desenvolver um sistema para tratar touros pré-púberes com FSH exógeno, de forma a afetar positivamente o desenvolvimento de seus testículos. O tratamento com FSH foi administrado sob a forma do produto Folltropin-V, (Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá). Uma parte do experimento incluiu a adição de ácido hialurônico (AH, 2%) como veículo para Folltropin-V. Considera-se que AH prolonga a liberação de um medicamento no seu local de absorção, por agir como um mucoadesivo (Surini et al., 2003). Para obter concentrações similares de hormônio alcançadas por pesquisadores anteriores, em touros pré-púberes, administramos semanalmente 60 mg de NIH-FSH-S1 na forma de Folltropin-V. Com base no desempenho estimado da capacidade de liberação gradual de AH 2%, no presente experimento administramos 30 mg de Folltropin-V em AH 2% duas vezes por semana (a cada 3,5 dias), com o objetivo de conseguir níveis suprafisiológicos de FSH nos

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

touros (Bo & Mapletoft, 2012; Tribulo et al., 2012). Dois experimentos foram realizados. O objetivo do primeiro foi classificar as concentrações séricas de FSH obtidas pelo tratamento com FSH exógeno. O objetivo do segundo foi implantar o tratamento com FSH em um período de tratamento de 8 semanas em touros pré-púberes, e examinar seu efeito sobre o desenvolvimento dos testículos.

Para esclarecer os métodos do primeiro experimento, dez bezerros mestiços de Angus com idades similares foram aleatoriamente divididos entre dois tratamentos. Começando com $50 \pm 6,5$ dias de idade, os animais receberam uma injeção com 30 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V) em solução de ácido hialurônico a 2% (FSH, $n = 5$) ou solução fisiológica (controle, $n = 5$) a cada 3,5 dias durante uma semana. As injeções intramusculares foram aplicadas no pescoço, assegurando que o bolus todo fosse injetado em uma única área, alternando o lado. Amostras de sangue para avaliar o nível de FSH foram coletadas imediatamente antes de cada tratamento e a cada 6 horas depois do tratamento, por um período de 24 horas. Depois deste período, as amostras de sangue para avaliar FSH e testosterona foram coletadas a cada 12 horas. O tratamento com FSH em ácido hialurônico a 2% elevou as concentrações de FSH de forma passageira (Figura 3), e este tratamento foi implantado em estudo subsequente para examinar seu efeito sobre o desenvolvimento dos testículos.

No segundo experimento, vinte e dois bezerros mestiços de Angus foram aleatoriamente divididos entre dois grupos tratados, com base na data de nascimento e pedigree. Com início aos $35 \pm 2,0$ dias de idade, os animais receberam injeção intramuscular com 30 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V) em solução de ácido hialurônico a 2% (FSH, $n = 11$) ou solução fisiológica (controle, $n = 11$) a cada 3,5 dias até terem 91 dias de idade. Os tratamentos foram administrados da mesma maneira que no experimento anterior. Amostras de sangue para avaliar o nível de FSH foram coletadas imediatamente antes de cada tratamento e a cada 3,5 dias de 35 a $91 \pm 2,0$ dias de idade, totalizando 17 coletas. As amostras de sangue para avaliar a testosterona foram coletadas da mesma maneira e ao mesmo tempo que as amostras para avaliar FSH. Os animais foram castrados aos 93 ± 2 dias de idade e seus testículos coletados para obter diversas medidas lineares, bem como o peso e o

volume do testículo e do epidídimo. Na castração, foram coletados três cortes histológicos para medir o diâmetro dos túbulos seminíferos, usando um micrômetro ocular, bem como para medir a porcentagem de testículo formada por túbulos seminíferos. Para quantificar o número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo seminífero, foi otimizada uma coloração GATA-4 imunohistoquímica que foi utilizada para corar os cortes histológicos de testículo para cada touro, como descrito por McCoard et al. (2001). Foram contados núcleos de célula de Sertoli corados, presentes em uma monocamada circular dentro do túbulo redondo. Os cortes histológicos corados por GATA-4 de touros pré-púberes foram comparados com cortes corados touros pós-púberes, com 18 meses de idade, para verificar se GATA-4 realmente corava de forma seletiva as células de Sertoli (Figura 4). Por fim, as concentrações intratesticulares de testosterona foram determinadas para cada touro, usando fragmentos de parênquima testicular homogeneizado. As concentrações intratesticulares de testosterona (ITT) foram medidas em amostras após a escolha de uma diluição apropriada, para que todas as amostras caíssem na curva padrão do radioimunoensaio.

Durante o tratamento de 35 a 91 dias de idade, os animais apresentaram concentrações de testosterona sistêmica diferentes apenas no dia 84, quando os animais controle tiveram concentração mais elevada. Não houve diferenças nas concentrações de FSH entre os tratamentos dos 35 aos 67,5 dias de idade, mas aumentou ($P < 0,05$) no tratamento com FSH aos 70 dias de idade e manteve-se elevado em relação aos níveis anteriores até os 91 d de idade. Este aumento no FSH aos 70 dias de idade nos touros que receberam pFSH também foi maior ($P < 0,05$) do que os níveis controle em qualquer momento do estudo. Os níveis controle não mudaram durante o período de amostragem de sangue (Figura 5). Não houve diferenças no peso ou no volume post mortem dos testículos nos tratamentos. A histologia não revelou diferenças na porcentagem de parênquima formado por túbulos seminíferos ou no diâmetro dos túbulos seminíferos entre os tratamentos (Tabela 3). A imunohistoquímica mostrou que os touros tratados com FSH tiveram mais células de Sertoli por túbulo seminífero redondo nos cortes transversais do que o controle (Tabela

3). Não houve diferença entre os grupos tratados com relação à concentração de testosterona intratesticular (Tabela 3).

Um achado interessante deste experimento foi que o tratamento com FSH exógeno resultou em elevação das concentrações de FSH endógeno. É importante observar que as amostras em que o FSH foi analisado foram coletadas antes das injeções de FSH em intervalos de 3,5 dias. E, com base nos achados do experimento preliminar, desta vez as concentrações elevadas não foram resultado do tratamento anterior com FSH mas foram devidas à elevação das concentrações de FSH de fontes endógenas. Atualmente, estamos realizando análises que poderão nos permitir um entendimento melhor de como a suplementação com FSH exógeno conseguiu elevar as concentrações endógenas de FSH nos touros tratados. O tratamento FSH-AH também afetou positivamente o desenvolvimento dos testículos por aumentar o número de células de Sertoli. Um ponto importante é que, se o aumento no número de células de Sertoli foi um efeito permanente do tratamento FSH-AH, a nossa hipótese é que isto poderia se traduzir em um aumento na produção de espermatozóides maduros. Assim sendo, seria interessante examinar em experimentos futuros se os efeitos positivos sobre os testículos causados pela suplementação pré-púbere de FSH, em fase precoce da vida, persistem até fase adulta e se estas alterações se traduzem em puberdade antecipada ou maior produção de espermatozóides maduros.

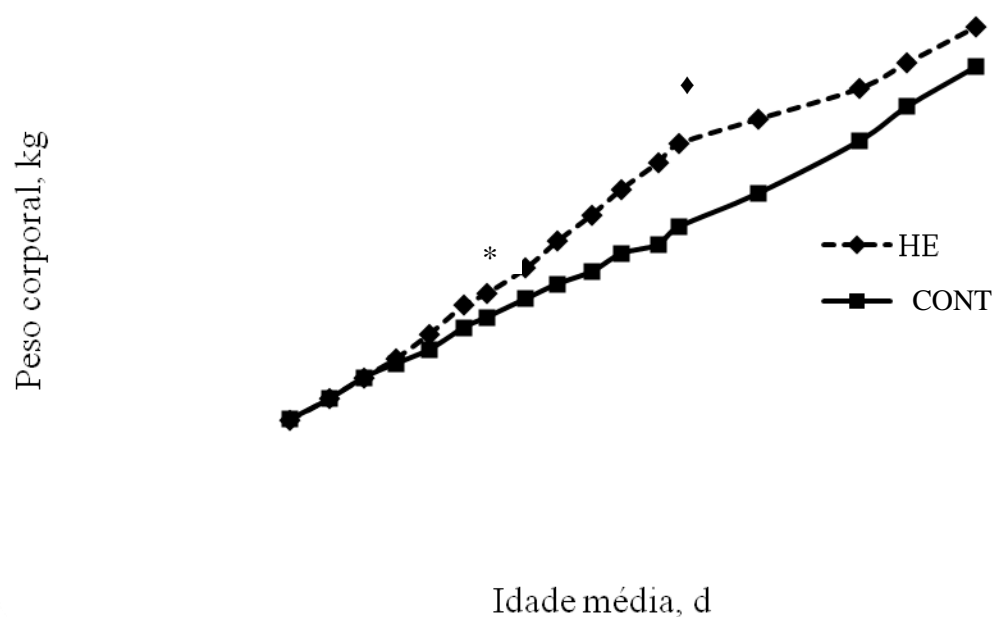
Resumo

O uso de genômica é uma importante razão por trás do desejo de antecipar a puberdade em touros destinados às empresas de IA. Nesta revisão, foram resumidas várias décadas de pesquisa e os exemplos mais recentes de trabalho pertinente, realizado pelo nosso laboratório, foram descritos de forma detalhada. As tentativas de antecipar a puberdade e, possivelmente, aumentar a produção de espermatozóides em touros contam com a mudança da endocrinologia pré-púbere e enfocam três métodos: imunizações com o objetivo de reduzir o feedback negativo das gonadotropinas, a adição de gonadotropinas exógenas e o uso de dietas de alto teor energético,

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

buscando intensificar ou acelerar a endocrinologia associada ao início da puberdade. Até aqui, nosso laboratório teve como foco específico a suplementação de hormônio (FSH) exógeno, bem como o uso de dietas ricas em energia para procurar acelerar a puberdade e afetar o desenvolvimento testicular. Outros laboratórios realizaram pesquisas similares à nossa, que resultaram em avanços igualmente promissores no sentido de melhorar o desenvolvimento pré-púbere em touros. No entanto, achamos que novos estudos ajudando a especificar as idades ideais para implantar tratamentos hormonais ou nutricionais ainda exigem atenção. O desejo relativamente recente de coletar sêmen de touros em idades o mais baixas possível provavelmente será a força motriz por trás desta pesquisa.

Figura 1.



* Tratamentos são diferentes aos 146 d de idade e depois disso, ($P < 0,05$)

♦ Touros (HE, $n = 8$; CONT, $n = 7$) transferidos para Select Sires, Inc.

Figura 2.

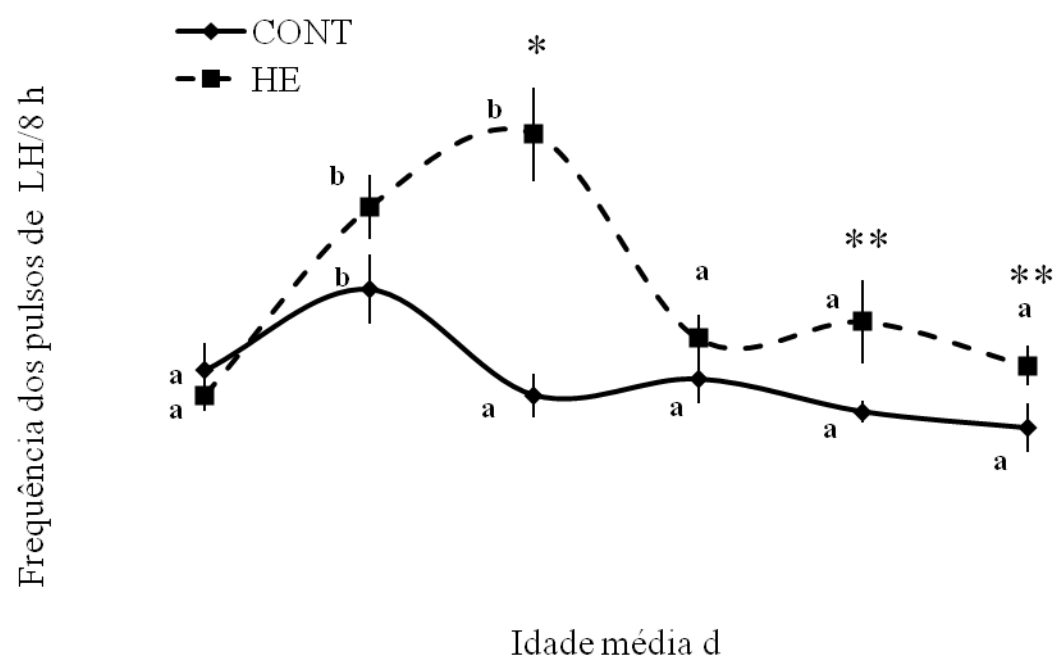


Figura 3. As concentrações sistêmicas de FSH em bezerros machos detectadas por um radioimunoensaio com anticorpo duplo bovino/ovino, depois de injeção com 30 mg NIH-FSH-P1 em ácido hialurônico a 2% (FSH) ou solução fisiológica (controle). Os tratamentos, indicados por setas partindo do eixo x, foram feitos com $50 \pm 6,5$ dias de idade e $53,5 \pm 6,5$ dias de idade. Após o tratamento, foi coletado sangue a cada 6 horas durante um período de 24 horas e depois a cada 12 horas. Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os níveis sistêmicos de FSH entre os tratamentos, 6 horas depois de cada um dos dois tratamentos. Asterisco duplo indica uma tendência ($P \leq 0,08$) para diferença entre os níveis de FSH entre os tratamentos, 12 horas depois do tratamento nos dois casos. Não houve diferenças nas concentrações séricas de FSH de 18 a 84 horas depois de cada tratamento.

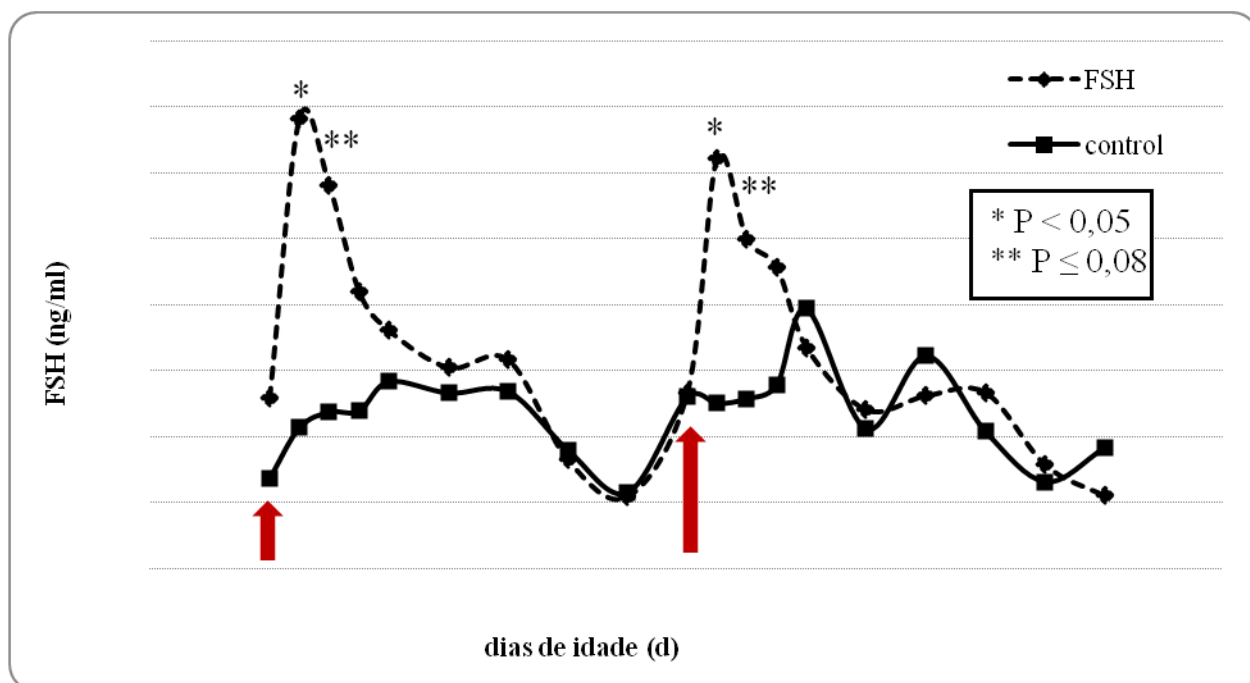


Figura 4. Imunolocalização de GATA-4 em núcleos de células de Sertoli (SC) em testículos de touro. Para visualizar todos os núcleos de células presentes, todas as lâminas tiveram contracoloração com hematoxilina. Tanto o testículo pré-púbere **(B)** como o pós-púbere **(D)** com coloração GATA-4 exibindo os núcleos das células de Sertoli (SC) coradas em marrom avermelhado dentro dos túbulos seminíferos. As células germinativas (GC) permaneceram sem coloração e são observadas tanto nas imagens pré-púbere **(B)** como pós-púbere **(D)**. Deve ser observado que os núcleos das células de Leydig foram corados de modo não seletivo nos animais pré-púberes e pós-púberes, mas como as células de Leydig não são encontradas dentro túbulos seminíferos, a análise dos números de células de Sertoli com base imunohistoquímica foi considerada válida. Os painéis **(C)** e **(D)** apresentam cortes em que o peptídeo bloqueador de GATA-4 foi usado para confirmar a especificidade do anticorpo primário em touros pré-púberes e pós-púberes, respectivamente. A aparência nos Painéis C e D foram idênticas nos cortes corados apenas com hematoxilina, indicando as vantagens de usar procedimentos de coloração GATA-4 para identificar núcleos de célula de Sertoli em touros. A barra de aumento em cada microfotografia representa 100 μm .

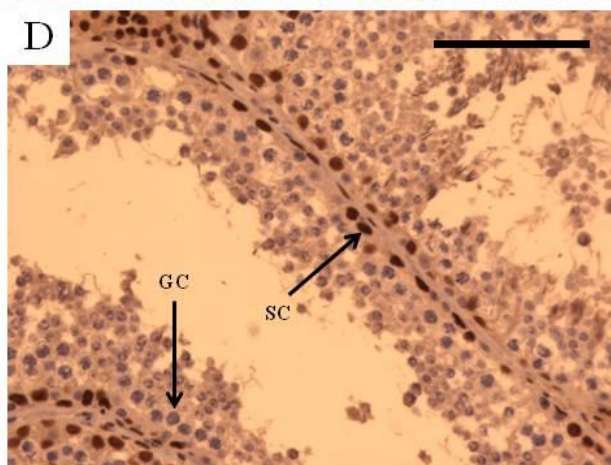
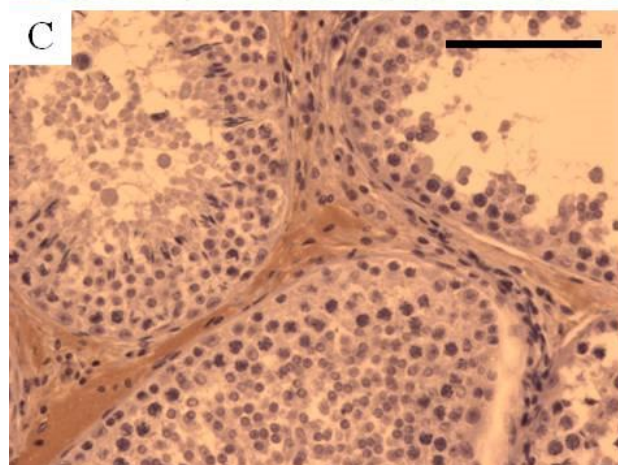
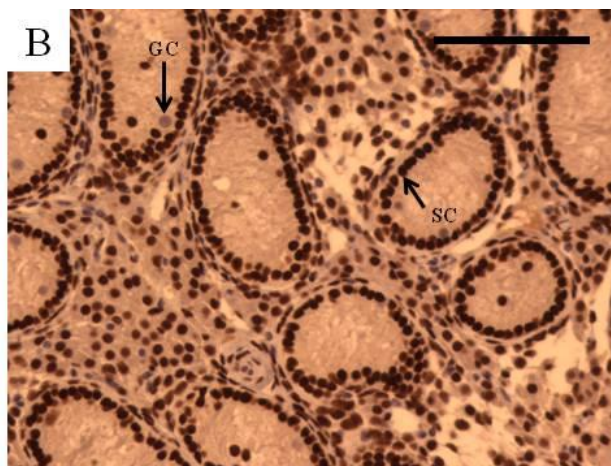
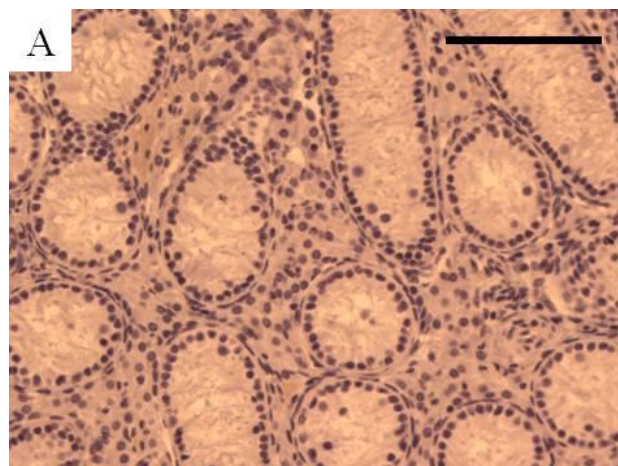


Figura 5. As concentrações sistêmicas médias de FSH medidas por radioimunoensaio com anticorpo duplo bovino/ovino imediatamente antes do tratamento dos touros com 30 mg pFSH (FSH, n = 11) ou Solução Fisiológica (controle, n = 11) a cada 3,5 dias de 35 a 91 dias de idade. O asterisco indica um aumento ($P < 0,05$) observado no tratamento com FSH começando aos 70 dias de idade, e este aumento foi mantido e maior do que nos touros do grupo controle até os 91 dias de idade.

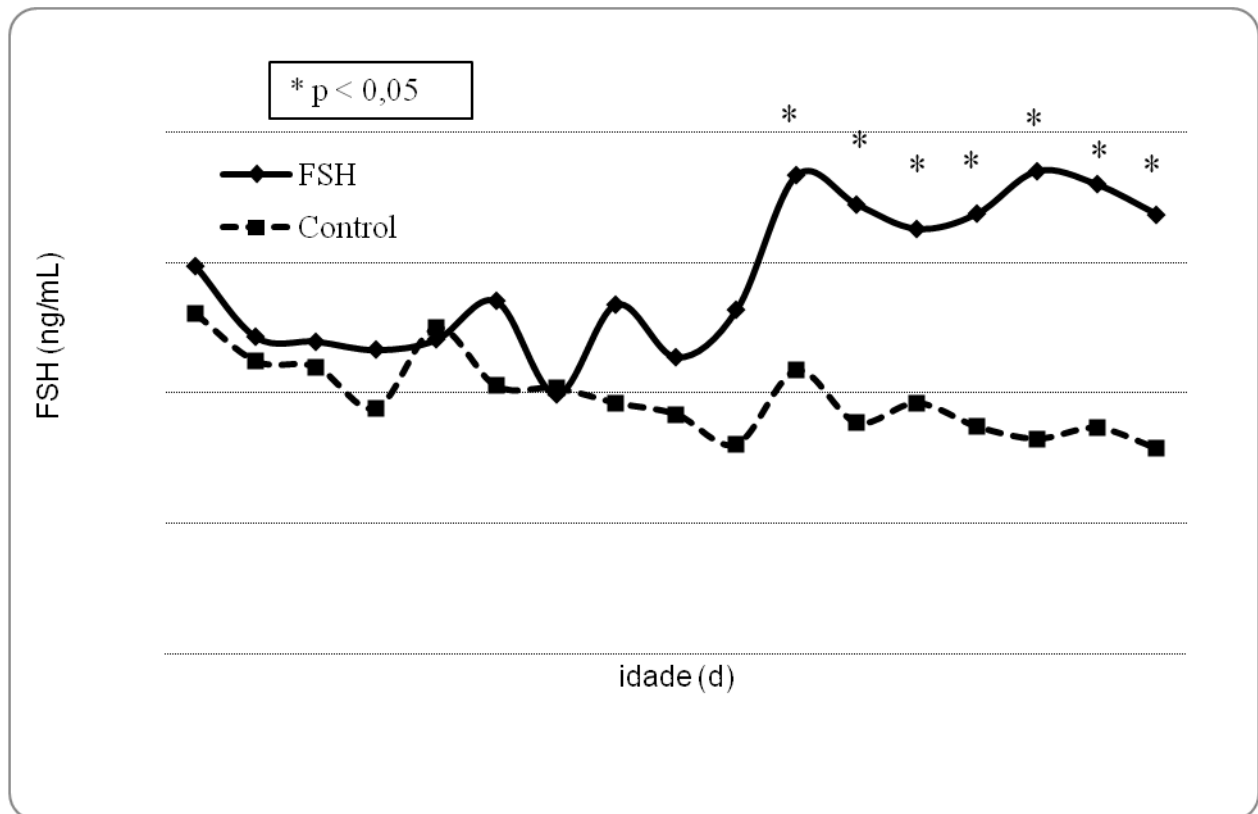


Tabela 1. Composição das dietas experimentais (rica em energia, HE; dieta controle, CONT) fornecida a touros Holandeses de $58 \pm 0,3$ a $230 \pm 0,3$ d de idade (2,5 – 3% do peso corporal).

Ingrediente	HE	CONT
Milho moído (%)	63,4	33,9
Farelo de soja (%)	13,9	15,1
Casca de soja (%)	5,7	23,1
Grãos secos de destilaria (%)	11,4	0
Farelo de alfafa (%)	0	23,3
Ureia (%)	0,9	0,8
Premix Vitaminas/Minerais ¹ (%)	4,7	3,8

¹ Suplemento de Vitaminas/Minerais atende as necessidades estabelecidas pelo NRC e inclui Calcário, Fosfato Bicálcico, Sal com Oligoelementos, Vitaminas A, D e E, Selênio, Óxido de Magnésio, Sulfato de Zinco e Sulfato de Cobre.

Tabela 2. Medidas testiculares, diâmetro do túbulo seminífero e porcentagem de parênquima testicular formado por túbulos seminíferos (Média \pm EPM, 569 d de idade) para touros Holandeses arraçoados com uma dieta rica em energia (HE) ou controle (CONT) de 58 a 230 \pm 0,3 d de idade (HE, n = 8; CONT, n = 7).

Variável	CONT	HE	Significância
Peso testículo (g)	267,5 \pm 14,4	318,0 \pm 13,5	P < 0,05
Peso epidídimo (g)	28,0 \pm 1,2	31,6 \pm 1,1	P < 0,05
Volume testículo (cm ³)	244,9 \pm 12,9	305,0 \pm 11,9	P < 0,01
Diâmetro Túbulo Seminífero (µm)	252,8 \pm 7,5	251,7 \pm 7,0	P = 0,95
Porcentagem parênquima túbulo (%)	71,8 \pm 2,1 %	72,3 \pm 2,0 %	P = 0,86

Tabela 3. Medidas testiculares post-mortem, avaliações histológicas e concentração intratesticular de testosterona (ITT) de um testículo de touros de 93 dias de idade, tratados com 30 mg pFSH (FSH, n = 11) ou com solução fisiológica (controle, n = 11) a cada 3,5 dias dos 35 aos 91 dias de idade. Não houve diferenças entre os tratamentos em nenhuma das medidas, exceto pelo número de células de Sertoli por túbulo em corte transversal (P = 0,0008). Os resultados são apresentados como média \pm EP.

Variável	Controle	FSH	Significância
Volume testículo (ml)	221,7 \pm 1,7	222,9 \pm 3,1	0,78
Peso testículo (g)	23,43 \pm 2,0	24,14 \pm 2,4	0,87
Diâmetro túbulo seminífero (μ m)	78,6 \pm 2,1	80,2 \pm 2,1	0,6
Porcentagem parênquima testicular formado por túbulos seminíferos	51,0%	51,9%	0,18
células de Sertoli por túbulo em corte transversal	28,27 \pm 0,9	33,35 \pm 0,9	0,0008
Testosterona intratesticular (ng/g)	806,1 \pm 100,8	738,9 \pm 96,1	0,63

Referências bibliográficas

Amann, R.P. 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Dairy. Sci.* 66:2606-2622.

Amann, R.P., M.E. Wise, J.D. Glass and T.M. Nett. 1986. Prepubertal changes in the hypothalamic-pituitary axis of Holstein bulls. *Biology of Repro.* 34:71-80.

Amann, R.P. and J.M. DeJarnette. 2012. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Therio.* 77:795-817.

Amann, R.P. and O. Walker. 1983. Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 57:422-433.

Anderson, L.H., C.M. McDowell and M.L. Day. 1996. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. *Biol. Reprod.* 54:1025-1031.

Aravindakshan, J.P., A. Honaramooz, P.M. Bartlewski, A.P. Beard, R.A. Pierson and N.C. Rawlings. 2000. Gonadotropin secretion in prepubertal bull calves born in spring and autumn. *J. Reprod. and Fert.* 120:159-167.

Atanassova, A-M., C. McKinnell, M. Walker, K. Turner, J. Fisher, M. Morley, M. Millar, N. Groome and R. Sharpe. 1999. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endo.* 140:5364-5373.

Bagu, E.T., S. Madgwick, R. Duggavathi, P. Bartlewski, D. Barrett, S. Huchkowsky, S. Cook, and N. Rawlings. 2004. Effects of treatments with LH or FSH from 4 to 8 weeks of age on the attainment of puberty in bull calves. *Therio.* 62:861-873.

Bagu, E.T., S. Cook, C.L. Gratton and N.C. Rawlings. 2006. Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reprod.* 132:403-411.

Bame, J., S. Degelos, T. Good, J. Ireland, F. Jimenez-Krassel and T. Sweeny. 1999. Effect of Long-Term Immunization against Inhibin on Sperm Output in Bulls. *Bio. Repro.* 60:1360-1366.

Barakat, B., A.E. O'Conner, E. Gold, D.M. de Kretser and K.L. Loveland. 2008. Inhibin, activin, follistatin and serum FSH levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reprod.* 136:345-359.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Barth, A.D. 2004. Pubertal development of *Bos taurus* beef bulls. Proc. WBC Congress, Quebec, Canada.

Blanchard, T and L. Johnson. 1997. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell number: Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Therio*. 47(4):665-677.

Blood, D.C. and V.P. Studdert. 1999. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. Second Edition. W.B. Saunders, London, p. 942.

Bó, G. and R. Mapletoft. 2012. Recent advances in the control of follicular development and superovulation protocols in cattle. 2012. 28th Annual AETS Meeting. 8 Sept. 2012.

Brito, L.F., A.D. Barth, N.C. Rawlings, R.E. Wilde, D.H. Crews, Y.R. Boisclair, R.A. Ehrhardt and J.P. Kastelic. 2007. Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reprod*. 134:171-181.

Burke, C.R., H. Cardenas, M.L. Mussard and M.L. Day. 2005. Histological and steroidogenic changes in dominant follicles during oestradiol-induced atresia in heifers. *Reprod*. 129:611-620.

Buzzard, J.J., K.L. Loveland, M.K. O'Bryan, A.E. O'Conner, M. Bakker, T. Hayashi, N.G. Wreford, J.R. Morrison and D.M. Kretser. 2004. Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and Activin A during postnatal development in the rat. *Endo*. 145(7):3532-3541.

Campbell, R.E., G. Gaidamaka, S.K. Han and A.E. Herbison. 2009. Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proceedings Natl Acad. Sci. U.S.A.* 106(26):10835-10840.

Chandolia, R.K., A.C.O. Evans and N.C. Rawlings. 1997a. Effect of inhibition of increased gonadotropin secretion before 20 wk of age in bull calves on testicular development. *J. Reprod. Fert.* 109:65-71.

Chandolia, R.K., A. Honaramooz, B.C. Omeke, R. Pierson, A.P. Beard and N.C. Rawlings. 1997b. Assessment of development of the testes and accessory sex glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Therio*. 48:119-132.

Chandolia, R.K. A. Honaramooz, P.M. Bartlewski, A.P. Beard and N.C. Rawlings. 1997c. Effects of treatment with LH releasing hormone before the early rise in LH secretion on endocrine and reproductive development in bull calves. *J. Reprod. Fert.* 111:41-50.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Coulter, G.H. 1986. Puberty and postpubertal development of beef bulls. In Current Therapy In Theriogenology. Edited by Morrow, D.A., W.B. Saunders, Philadelphia. 142-148.

Curtis, S.K. and R.P. Amann. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. J. Anim. Sci. 53:1645-1657.

Dadoune, J.P. and A. Demoulin. 1993. "Structure and functions of the testis" in Reproduction in Mammals and Man. C. Thibault, M.C. Levasseur and R.H.F. Hunter. Ellipses, Paris.

Dance, A., Thundathil, J., Wilde, R., Blondin, P. and J. Kastelic. 2015. Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. J. Dairy Sci. 98(2):987-998.

Day, M.L. and L.H. Anderson. 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. J. Anim. Sci. 76(Suppl. 2): 1-15.

de Kretser, D.M. and D.J. Phillips. 1998. Mechanisms of protein feedback on gonadotropin secretion. J. Reprod. Immuno. 39:1-12.

Dias, J.A. and J.J. Reeves. 1982. Testicular FSH receptor numbers and affinity in bulls of various ages. J. Reprod. Fert. 66: 39-45.

Dickson, R.B. and C.R. Clark. 1981. Estrogen receptors in the male. Andrology. 7:205-217.

Evans, A.C.O., W.D. Currie and N.C. Rawlings. 1993. Opioidergic regulation of gonadotropin secretion in the early prepubertal calf. J. Reprod. and Fert. 99:45-51.

Evans, A.C.O., W.D. Currie and N.C. Rawlings. 1993. Opioidergic regulation of gonadotropin secretion in the early prepubertal calf. J. Reprod. and Fert. 99:45-51.

Evans, A.C.O., F.J. Davies, L.F. Nasser, P. Bowman and N.C. Rawlings. 1995. Differences in early patterns of gonadotropin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. Therio 43:569-578.

Flipse, R.J. and J.O. Almquist. 1961. Effect of total digestible nutrient intake from birth to four years of age on growth and reproductive performance of dairy bulls. J. Dairy Sci. 44:905.

Gasser, C. L., E. J. Behlke, D. E. Grum and M. L. Day. 2006a. Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. J. Anim. Sci. 84:3118–3122.

Gasser, C. L., G. A. Bridges, M. L. Mussard, D. M. Dauch, D. E. Grum, J. E. Kinder and M. L. Day. 2006b. Induction of precocious puberty in heifers III: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 84:2050–2056.

Gasser, C. L., C. R. Burke, M. L. Mussard, E. J. Behlke, D. E. Grum, J.E. Kinder and M. L. Day. 2006c. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *J. Anim. Sci.* 84:2042–2049.

Gasser, C. L., D. E. Grum, M. L. Mussard, F. L. Fluharty, J. E. Kinder and M. L. Day. 2006d. Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 84:2035–2041.

Gilula, N.B., D.W. Fawcett and A. Aoki. 1976. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Dev. Biol.* 50(1):142-168.

Griswold, M.D. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9(4):411-416.

Hardy, M.P., W.R. Kelce, G.R. Klinefelter and L.L. Ewing. 1990. Differentiation of Leydig Cells precursors *in vitro*: a role for androgen. *J. Endo.* 127:488-490.

Harstine, B.R., M. Maquivar, L.A. Helser, M.D. Utt, C. Premanandan, J.M. DeJarnette and M.L. Day. 2015. Effects of dietary energy on sexual maturation and sperm production in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* doi: 10.2527/jas2015-8952

Henricks, D., J. Hoover, T. Gimenez and L. Grimes. 1988. A study of the source of estradiol-17 beta in the bull. *Horm. Met. Research.* 20:494-497.

Hochereau-de Reviers, M.T., C. Monet-Kuntz and M. Courot. 1987. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34:101-114.

Humblot, P., D. LeBourhis, S. Fritz, J.J. Colleau, C. Gonzalez, CG. Joly, A. Malafosse, Y. Heyman, Y. Amigues, M. Tissier and C. Ponsart. 2010. Review: Reproductive Technologies and Genomic Selection in Cattle. *Vet. Med. Internatl.* Volume 2010: 8 pages.

Kaneko, H., J. Noguchi, K. Kikuchi, S. Akagi, A. Shimada, K. Taya and G. Wantanabe. 2001. Production and Endocrine Role of Inhibin During the Early Development of Bull Calves. *Bio. Repro.* 65:209-215.

Kaneko, H., M. Yoshida, Y. Hara, K. Taya, K. Araki, G. Watanabe, S. Sasamoto and Y. Hasegawa. 1993. Involvement of inhibin in the regulation of FSH secretion in prepubertal bulls. *J. Endo.* 137:15-19.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Kolho, K.L. H. Nikula and I. Huhtaniemi. 1987. Sexual maturation of male rats treated postnatally with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. J. Endo. 116:241- 246.

Lacroix, A. and J. Pelletier. 1979. LH and testosterone release in developing bulls following LH-RH treatment. Effect of gonadectomy and chronic testosterone propionate pre-treatment. ACTA Endocrinologica. 91:719-729.

Leal, M., Becker-Silva, S., Chiarini-Garcia, H and L. Franca. 2004. Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). Anim. Reprod. 1,1:122-128.

Lunstra, D. and S. Echternkamp. 1982. Puberty in Beef Bulls: Acrosome Morphology and Semen Quality in Bulls of Different Breeds. J. Anim. Sci. 55:638-648.

Lunstra, D., J. Ford and S. Echternkamp. 1978. Puberty in Bulls: hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. J. Anim. Sci. 46:1054-1062.

Lunstra, D.D., T.L. Martin, G.L. Williams and J.J. Ireland. 1993. Immunization against inhibin increases sperm production in young beef bulls. Beef Research Program: Roman L. Hruska U.S. Meat Animal Research Center. Paper 144:93-95.

MacDonald, R., D. Deaver and B.D. Schanbacher. 1991. Prepubertal Changes in Plasma FSH and Inhibin in Holstein bull calves: Responses to Castration and(or) Estradiol. USDA-ARS/UNL Faculty. Paper 779.

Madgwick, S., E.T. Bagu, R. Duggavathi, P.M. Bartlewski, D.M.W. Barrett, S. Huchkowsky, S.J. Cook, A.P Beard and N.C. Rawlings. 2008. Effects of treatment with GnRH from 4 to 8 weeks of age on the attainment of sexual maturity in bull calves. Anim. Reprod. Sci. 104:177-188.

Mann, T., L.E.A. Rowson, R.V. Short and J.D. Skinner. 1967. The relationship between nutrition and androgenic activity in pubescent twin calves and the effect of orchitis. J. Endo. 38:455-462.

Martig, R.C. and J.O. Almquist. 1969. Reproductive capacity of beef bulls. III. Postpubertal changes in fertility and sperm morphology at different ejaculate frequencies. J. Anim. Sci. 28:375

Martin, T., D. Lunstra and J. Ireland. 1991. Immunoneutralization of Inhibin Modifies Hormone Secretion and Sperm Production in Bulls. Bio. Repro. 45:73-77.

Matzuk, M.M., T.R. Kumar and A. Bradley. 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. Nature. 374(6520):356-360.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

McCarthy, M.S., H.D. Hafs and E.M. Convey. 1979. Serum hormone patterns associated with growth and sexual development in bulls. *J. Anim. Sci.* 49:1012-1020.

McCoard, S.A., D.D. Lunstra, T.H. Wise and J.J. Ford. 2001. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biol. Reprod.* 64(2):689-695.

McEwen, B.S. 1980. Gonadal Steroids: Humoral modulators of nerve cell function. *Mol. Cell Endo.* 18:151-164.

McLachlan, R.I., N.G. Wreford, D.M. de Kretser and D.M. Robertson. 1995. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endo.* 136(9):4035- 4043.

Meachem, S., J. Aiolkowski, J. Ague, M. Skinner and K. Loveland. 2005. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J. Endo.* 186:429-446.

Meachem, S., R. McLachlan, D. de Kretser, D. Robertson and N. Wreford. 1996. Neonatal exposure of rat to recombinant follicle-stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol. Reprod.* 54:36-44.

Mendis-Handagama, S.L.M.C. and H.B.S. Ariyaratne. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.* 65:660-671.

Myers, S. and L. Swanson. 1983. The Effect of Exogenous Follicle Stimulating Hormone Treatment on Anterior Pituitary and Testicular Function in the Prepubertal Bull. *J. Andrology.* 4,6:371-377.

Orth, J.M. 1984. The Role of Follicle-Stimulating Hormone in Controlling Sertoli Cell Proliferation in Testes of Fetal Rats. *Endocrinology.* 115(4): 1248-55.

Pruitt, R.J., L.R. Corah, J.S. Stevenson and G.H. Kiracofe. 1986. Effect of energy intake after weaning on sexual development of beef bulls. II. Age at first mating, age at puberty, testosterone and scrotal circumference. *J. Anim. Sci.* 63:579.

Purvis, K., R. Calandra, O. Naess, A. Attramadal, P.A. Torjesen and V. Hansson. 1977. Do androgens increase Leydig cell sensitivity to luteinising hormone. *Nature* 265:169-170.

Raivio, T., A. Wikstrom and L. Dunkel. 2007. Treatment of gonadotropin-deficient boys with recombinant human FSH: long-term observation and outcome. *Europ. J. Endo.* 156:105-111.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Rawlings, N.C. and A.C.O. Evans. 1995. Androgen negative feedback during the early rise in LH secretion in bull calves. *J. Endocrin.* 145:243-249.

Rodriguez, R.E. and M.E. Wise. 1989. Ontogeny of Pulsatile Secretion of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Bull Calf during Infantile and Pubertal Development. *Endo.* 124(1):248-256.

Ruaw, W.M., E. Kanis, E.N. Noordhuizen-Stassen and F.J. Grommer. 1998. Undesirable side effects of selections for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Prod. Sci.* 56:15-33.

Schefers, J.M. and K.A. Weigel. 2012. Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. *Animal Frontiers.* Vol. 2. No. 1:4-9.

Schwanzel-Fukuda, M. and D.W. Pfaff. 1989. Origin of luteinizing-hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 338:161-164.

Senger, P.L. 1997. Pathways to Pregnancy and Parturition. Second Edition. Current Conceptions, Inc., Moscow, p.68.

Sharpe, R., C. McKinnell, C. Kivlin and J. Fisher. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Repro.* 125:769-784.

Skinner, M.K. and M.D. Griswold. 2005. Sertoli Cell Biology. San Diego: Elsevier, 2005. Print.

Surini, S., H. Akiyama and M. Morishita. 2003. Polyion complex of chitosan and sodium hyaluronate as an implant device for insulin delivery. *STP Pharm Sci.* 13: 265-268.

Tribulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Maplettoft and G. Bo. 2012. Superovulation of beefcattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Therio.* 77(8):1679-1685.

VanDemark, N.L., G.R. Fritz and R.E. Mauger. 1964. Effect of energy intake on reproductive performance of dairy bulls. II. Semen production and replenishment. *J. Dairy Sci.* 47:898.

VanDemark, N.L. and R.E. Mauger. 1964. Effect of energy intake of reproductive performance of dairy bulls. I. Growth, reproductive organs and puberty. *J. Dairy Sci.* 47:798.

Wilson, P.R. and K.R. Lapwood. 1979. Studies of reproductive development in Romney rams. I. Basal levels and plasma profiles of LH, testosterone, and prolactin. *Biol. Reprod.* 20:965-970.

XX Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos

Wise, M.E., R.E. Rodriguez and C.M. Kelly. 1987. Gonadal regulation of LH secretion in prepubertal bull calves. Domestic Anim. Endo. 4:175-181.

Wolf, F., J. Almquist and E. Hale. 1965. Prepubertal Behavior and Puberal Characteristics of Beef Bulls on High Nutrient Allowance. J. Anim. Sci. 24:761-765.