

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA
(rBST) SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, HORMONAIS E DE
QUALIDADE DE SÊMEN EM TOUROS**

Marcelo Brandi Vieira

Pelotas, maio de 2007

MARCELO BRANDI VIEIRA

INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rBST)
SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, HORMONAIS E DE QUALIDADE
DE SÊMEN EM TOUROS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Veterinária da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências (área do conhecimento:
Clínica Médica).

Orientador: Dr. Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2007.

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

V658i Vieira, Marcelo Brandi

Influência da somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre parâmetros metabólicos, hormonais e de qualidade de sêmen em touros/Marcelo Brandi Vieira. - Pelotas, 2007.

60f

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007.

1. Metabolismo 2. Touros 3. Somatotropina recombinante bovina 4. Reprodução I Corrêa, Marcio Nunes (orientador) II .Título.

CDD 636.2082

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador – DCV/FV/UFPel)

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel (FV/UFPel)

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino (DB/UFPel)

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Mascarenhas Jobim (FV/UFRGS)

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais,
Quintiliano e Maria Lydia por serem os meus
maiores exemplos de vida...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela dádiva da vida.

Aos avós, João Severo Vieira, Inês Vieira, Pascoal Brandi e Lydia Brandi, por todo apoio destinado e por todos ensinamentos.

As minhas queridas irmãs, Beatriz, Cristina, Ângela e Joana, por todo carinho, mesmo estando longe.

A Fernanda por todo carinho e atenção dedicados, e principalmente por compartilhar, amor, sonhos e muitas alegrias ao meu lado.

Ao orientador e grande amigo Prof. Marcio Nunes Corrêa por ter me dedicado sua confiança na realização deste trabalho. Agradeço de forma especial, todo apoio e todas oportunidades de crescimento proporcionadas durante este período.

Ao Médico Veterinário Neimar Corrêa Severo da empresa ABS/PECPLAN pelo grande apoio para a realização deste trabalho.

Ao professor Francisco Augusto Burket Del Pino, pelos conhecimentos passados e por nos receber de forma muito acolhedora em seu laboratório.

Aos professores João Carlos Deschamps e Thomaz Lucia Jr. pelos ensinamentos prestados e por nos disponibilizar a estrutura para que fossem realizadas as análises de sêmen.

A Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas e amigos Luiz Francisco Machado Pfeifer, José Acélio S. da Fontoura Júnior, Eduardo Schmitt, Viviane Rohrig Rabassa, Talita Bandeira Roos, pelo apoio e amizade dedicados.

Aos amigos Vinícius Coitinho Tabeleão e Ivan Bianchi pela cooperação e incentivo em todos os momentos.

A todos que neste período integraram a equipe do Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Pecuária (NUPEEC) e o grupo PIGPEL, em especial ao Augusto Schneider, Elizabeth Schwegler, Leonardo Menezes, Márcio Fonseca, Maikel Alan Goulart, Péricles Duarte, Kérilin Calderam, Elisângela Madeira, Eder

Maschio e o Rafael Ulguim. Meus sinceros agradecimentos por toda colaboração na execução dos trabalhos.

RESUMO

VIEIRA, Marcelo Brandi. **Influência da somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre parâmetros metabólicos, hormonais e de qualidade de sêmen em touros**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

O hormônio do crescimento (GH) possui como principal função realizar a proliferação e desenvolvimento celular, participando também de processos relacionados ao sistema imune e a reprodução. O efeito do GH é exercido pelo IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I), que é um hormônio polipeptídico mitótico secretado por todas as células que realizam mitose. A partir do desenvolvimento da forma recombinante da somatotropina recombinante bovina (rBST) foram desenvolvidos inúmeros estudos relacionados a produção de leite e carne em animais de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do rBST sobre marcadores metabólicos relacionados ao metabolismo energético, protéico, mineral e hepático, bem como avaliar o seu efeito nas concentrações de IGF-I, insulina e nos parâmetros de qualidade de sêmen em touros. Este estudo foi realizado na central de inseminação artificial ABS/PECPLAN, com 20 touros de raças predominantemente européias. Estes animais foram divididos em dois grupos, sendo que um grupo recebeu a aplicação do placebo (solução fisiológica, NaCl 0,9%) e outro rBST (Lactotropin[®]/Elanco Saúde Animal). Foram realizados 5 coletas de sangue para avaliação dos marcadores metabólicos e hormonais e 6 coletas de sêmen com posterior congelamento para a realização das correspondentes avaliações de sêmen. De acordo com os resultados não foi observado ($P > 0,05$) efeito do rBST nas avaliações dos marcadores metabólicos, exceto nas concentrações da enzima hepática gama - glutamiltransferase (GGT), que foi mais elevada no grupo que recebeu o rBST ($P < 0,05$), mas de acordo com os padrões fisiológicos. Nas avaliações hormonais os níveis de IGF-I foram mais elevados no grupo tratado com rBST ($P < 0,05$), não sendo, porém, observadas diferenças para os níveis de insulina ($P > 0,05$). Em relação às avaliações de sêmen, não foram observadas diferenças entre os dois grupos ($P > 0,05$) na motilidade e morfologia espermática avaliadas no período pré-congelamento. Nas avaliações pós-congelamento que incluíam a motilidade, morfologia, integridade de membrana

plasmática por sondas fluorescentes e pelo teste hiposmótico foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos, sendo demonstrado melhores índices no grupo que recebeu o tratamento com rBST. Desta forma pode-se observar que o rBST, além de elevar o níveis de IGF-I, influenciou positivamente as características seminais avaliadas no pós-congelamento sem que tivesse ocasionado desequilíbrio no metabolismo dos animais tratados, já que as concentrações dos marcadores metabólicos avaliados estavam de acordo com os padrões fisiológicos para a espécie bovina.

Palavras chave: metabolismo, touros, rBST, reprodução

ABSTRACT

VIEIRA, Marcelo Brandi. **Influence of bovine recombinant somatotropin (rBST) on metabolic parameters, hormones and semen quality of bulls.** 2007. Master's Dissertation - Programa de Pós- Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

The growth hormone (GH) have as main function improve proliferation and cellular development, but also participates of processes related to the immune system and reproductive function. The effect of GH is exerted by the IGF-I (insulin-like growth factor I), that is a hormone polypeptidic mitotic secreted by all cells that carry through mitosis. Since the development of the recombinant form of the bovine recombinant somatotropin (rBST) various studies have been developed on milk and meat production in farm animals. The objective of this study was to evaluate the effect of rBST on metabolic markers of energetic, protein, mineral and hepatic metabolism, as well as, to evaluate its effect on concentrations of IGF-I, insulin and quality parameters semen in bulls. This study was carried in central of artificial insemination ABS/PECPLAN using 20 bulls of european breeds. These animals were divided in two groups, a group that received a placebo application (NaCl, 0.9%) and another that received rBST (Lactotropin®/Elanco Animal Health). Five blood collections for evaluation of metabolic and hormonal markers and 6 semen collections with posterior freezing for the accomplishment of the corresponding semen evaluations. There was no effect of rBST ($P > 0,05$) in metabolic markers, except in the concentration of gamma- glutamyltransferase (GGT), that increased in the group that received rBST ($P < 0,05$), but inside the physiological range, in the hormones evaluations, IGF-I increased in the group treated with rBST ($P < 0,05$), but there wasn't difference in the insulin concentrations ($P > 0,05$). In relation to the semen evaluations, there were no differences observed ($P > 0,05$) in motility and morphology evaluated in the period before freezing. In after freezing evaluations, being that motility, morphology, integrity of plasmatic membrane by fluorescent sounding leads and the hiposmotic test, differences have been observed ($P < 0,05$) between groups, showing beneficial effect of rBST in these characteristics. In this way can be observed that rBST, beyond raising the IGF-I levels positively influenced the seminal after freezing characteristics evaluated without causing disequilibrium in the metabolism of treated animals since

the concentrations of the evaluated metabolic markers were in accordance with the physiological standards for the bovine species.

Keywords: bulls, metabolism, rBST, reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Esquema das coletas e tratamentos realizados durante o estudo (artigo 1)	38
Figura 2. Análises de regressão das concentrações de uréia, TAG, AST e GGT ajustadas em função do período de coleta em cada um dos grupos experimentais. Os gráficos da esquerda representam o GI e os da direita representam o GII (artigo1)	39
Figura 1. Esquema das atividades realizadas durante o estudo (artigo 2)	58
Figura 2. Análise de regressão das concentrações de IGF-I ajustadas em função do período de coleta em cada um dos grupos experimentais. Os gráficos da esquerda representam o GI (placebo) e os da direita representam o GII (rBST) (artigo 2)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias ($\pm$ EPM) dos marcadores bioquímicos, de acordo com os tratamentos e período das coletas. (artigo1)	37
Tabela 1. Efeito das aplicações do rBST (GI) e do placebo (GII) sobre as características seminais (Médias $\pm$ erro padrão) (artigo 2)	56
Tabela 2. Efeito da utilização de rBST sobre os índices de IGF-I e da insulina de acordo com os tratamentos com placebo (GI) e rBST (GII) (médias $\pm$ erro padrão) (artigo 2)	57

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	17
ARTIGO I EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rBST) SOBRE OS NÍVEIS DE MARCADORES METABÓLICOS DE TOUROS.....	20
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ARTIGO II EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (RBST) SOBRE OS NÍVEIS DE IGF-I, INSULINA E QUALIDADE DE SÊMEN DE TOUROS.....	41
RESUMO	42
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CONCLUSÕES GERAIS	60
APÊNDICE	

INTRUDUÇÃO GERAL

Atualmente, a pecuária de corte está retomando o seu crescimento econômico através da valorização dos preços, ocasionada pela diminuição da oferta de animais jovens, já que no ano de 2006 foram abatidos um número recorde de matrizes no Brasil, chegando a 40% do total de animais abatidos (IBGE). Neste contexto, em que se faz necessário aumentar os índices de produtividade, os touros representam uma categoria animal de importante influência na pecuária, pois além de participarem do processo de concepção, são responsáveis por grande parte do melhoramento genético do rebanho, seja com a utilização do sistema da monta natural ou inseminação artificial (Venter, 1982; Nichi, 2006). Porém, poucos estudos têm sido desenvolvidos com esta categoria animal, principalmente no que diz respeito às interações entre o metabolismo e a reprodução (Yilmaz *et al.*, 1999; Roudebush *et al.*, 2001).

A utilização da forma recombinante do hormônio do crescimento (rBST), que se deu início da década de 80, tem sido utilizada principalmente para estimular a produtividade de leite e carne em animais de produção (Sirotkin, 2004). O hormônio do crescimento (GH) é descrito como um hormônio anabólico, envolvido com inúmeras funções no organismo, sendo o principal responsável pelo crescimento e desenvolvimento celular, atuando também nos sistemas imune e reprodutivo. O tratamento com o GH possui efeito lipolítico, promovendo a liberação de ácidos graxos não esterificados na circulação sanguínea (McDowell & Annison, 1991). O tratamento também promove uma maior retenção de nitrogênio, diminuindo o catabolismo protéico (Breier, 1999). Receptores deste hormônio foram detectados em vários tecidos, dentre eles os tecidos reprodutivos do macho e da fêmea, exercendo uma função endócrina e parácrina (Hull and Harvey, 2000 a,b, 2001; Kaiser *et al.*, 2001; Marchal *et al.*, 2003).

A função do GH é exercida pelo IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I), que é um polipeptídeo mitótico secretado por todas as células mitogênicas. O fígado sob o estímulo da liberação pulsátil do GH pela hipófise anterior é o órgão responsável pela maior produção de IGF-I (Jones & Clemmons, 1995).

A utilização do GH em machos iniciou em humanos que apresentavam atraso na puberdade associada à deficiência deste hormônio, condição que a partir do

tratamento com GH foi normalizada (Gravance *et al.*, 1997; Breier *et al.*, 1998). Também pode se observar a sua influência na esteriodogênese e na espermatogênese através da detecção de receptores de IGF-I nas células de Leydig, as quais sob o estímulo deste hormônio aumentam a sensibilidade de seus receptores ao LH (Spiteri-Grech *et al.*, 1992). Além disso, o IGF-I é capaz de estimular a proliferação das células de Sertoli em animais pré-púberes (Roser, 2001). A maior produção de IGF-I testicular é realizada pelas células de Sertoli, sendo também produzido pelas células de Leydig (Handelsman *et al.*, 1985; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993; Gnassi, 1997). Segundo Groenewegen *et al.* (1990) a administração de rBST induz aumento nos níveis plasmáticos de IGF-I em touros.

Embora o sêmen bovino apresente boas características de congelabilidade, cerca de 50% da viabilidade espermática é perdida durante a criopreservação do sêmen (Watson, 1995), ocasionados pelo estresse térmico e osmótico. Desta forma é importante que o processo de espermatogênese ocorra de forma plena em equilíbrio com os mecanismos endócrinos, para que as células espermáticas suportem o processo de congelamento apresentando boas taxas de fertilização. A hipótese deste estudo é que o tratamento com rBST influencia os marcadores do metabolismo energético, protéico, mineral e hepático, assim como os níveis de IGF-I, insulina e os parâmetros qualitativos de sêmen de touros.

Neste contexto o objetivo desta dissertação foi avaliar o efeito do tratamento com rBST sobre os marcadores do metabolismo energético (triglicerídeos e colesterol), protéico (uréia), mineral (fosfatase alcalina e fósforo) e hepático (aspartato aminotransferase – AST e gama - glutamiltransferase- GGT) de touros (Artigo 1). Outro objetivo foi avaliar o efeito do rBST sobre os níveis de IGF-I, insulina e sobre as características de qualidade de sêmen de touros (Artigo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREIER, B.H., VICKERS, M.H., GRAVANCE, C.G., CASEY, P.J. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? *Endocrine Journal Supplement*; 45. 53–60. 1998.

Breier BH. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis
Research Centre for Developmental Medicine and Biology, Faculty of Medicine and
Health Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand; 17:209-218.1999.

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

GRAVANCE, C.G., BREIER, B.H., VICKERS, M.H., CASEY, P.J. Impaired sperm characteristics in postpubertal growth-hormone-deficient dwarf (dw/dw) rats *Animal Reproduction Science*; 49 71–76.1997.

GROENEWEGEN, P. P., B. W. MCBRIDE, J. H. BURTON, AND T. H. ELSASSER. Effect of bovine somatotropin on the growth rate, hormone profiles and carcass composition of Holstein bull calves. *Domest. h i m . Endocrinol.*;7:43. 1990.

HANDELSMAN, D.J.; SPALIVIERO, J.A.; SCOTT, C.D.; BAXTER, R.C. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. *Acta Endocrinol*; 190:543–549. 1985.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in male reproduction. *Endocrine* 13, 243–250. 2000a.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in male reproduction. *Endocrine* 13, 243–250. 2000a
Hull, K.L., Harvey, S., Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Reviews in Reproduction*. 5:175–182. 2000b.

- JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*; 16:3–34. 1995.
- KAISER, G.G.; SINOWATZ, F.; PALMA, G.A.,. Effects of growth hormone on female reproductive organs. *Anatomy, Histology and Embryology*; 30: 265–271. 2001.
- LARSON, J.L.; MILLER D.J. Can relative spermatozoal galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility? *J Dairy Sci*; 83:2473-2479. 2000.
- MARCHAL, R.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GERARD, N.; MERMILLOD, P.; GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger Rna expression in equine and porcine species. *Biology of Reproduction*; 69, 1013–1022. 2003.
- MCDOWELL, G.H.; ANNISON, E.F. Hormonal control of energy and protein metabolism. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY*, 7., 1991, London. Proceeding. London: Academic Press,. p.231-253. 1991.
- NICHI, M., P.E.J. BOLS , R.M. ZU"GE , V.H. BARNABE ,I.G.F. GOOVAERTS , R.C. BARNABE, CORTADA C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*; 822–828, 2006.
- ROSER, J. Endocrine e Paracrine control of sperm production in stallions. *Animal Reproductions Scince*. v. 68, p. 139-151, 2001.
- ROUDEBUSH, W.E., PURNELL, E.T., DAVIS, M.E. Impact of blood serum insulin-like growth factor I on platelet-activating factor in bull spermatozoa *Domestic Animal Endocrinology*; 20: 1–7.2001
- SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res*;38(Suppl 1):22–7. 1992.

SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis: a review. *J Reprod Fertil*; 98: 1–14. 1993.

VENTER, H.A.W. Importância da maturidade sexual precoce e da idade ao primeiro parto no gado de corte. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.453-9. 1982.

WATSON PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.*;7:871–891.1995.

YILMAZ, A., DAVIS, M. E., SIMMEN, R.C.M. Reproductive Performance of Bulls Divergently Selected on the Basis of Blood Serum Insulin-Like Growth Factor I Concentration. *J. Anim. Sci.* 77:835–839.1999.

ARTIGO 1

Efeito da somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre os níveis de marcadores metabólicos de touros

Effect of bovine recombinant somatotropin (rBST) on metabolic markers of bulls

Artigo formatado conforme as normas da revista Domestic Animal Endocrinology

Resumo

Muitos estudos relacionados ao metabolismo vêm sendo desenvolvidos avaliando a influência do hormônio do crescimento (GH) na produtividade de leite e carne em animais de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do rBST sobre os marcadores energéticos, protéico, minerais e hepáticos de touros mantidos em semi-confinamento. Este experimento foi realizado na central de inseminação artificial ABS/PECPLAN situada no município de Rosário do Sul, RS. Foram utilizados 20 touros de raças predominantemente européias, sendo divididos aleatoriamente em dois grupos (GI e GII), para que no GI fosse administrado via subcutâneo duas doses de placebo (NaCl, 0,9%) e o GII fosse administrado o rBST (Lactotropin[®]), na mesma via e frequência de aplicação. Foram realizadas 5 coletas de sangue para avaliação de TAG e colesterol como marcadores energéticos, uréia, como indicador protéico, fosfatase alcalina e fósforo como marcadores minerais e as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e a gama glutamiltransferase (GGT) como indicadoras da função hepática. O intervalo definido para os tratamento e coletas foi de 14 dias. De acordo com os resultados, o rBST não influenciou os marcadores energéticos, minerais, e protéico, exceto a enzima hepática GGT ($P < 0,05$), o mesmo não ocorrendo com a AST. Estes resultados indicam que a utilização do rBST em touros não alterou metabolismo, pois os parâmetros avaliados mantiveram-se de acordo com os padrões fisiológicos, incluindo a enzima GGT.

Palavras chave: metabolismo, rBST, touros.

Abstract

Many studies related to the metabolism come being developed evaluating the influence of the growth hormone (GH) in the productivity of milk and meat in production animals. The objective of this study was to evaluate the effect of rBST on metabolic markers for energy, protein, mineral and hepatic metabolism of bulls kept in semi-confinement. This experiment was carried in ABS/PECPLAN located in Rosario do Sul, RS. Twenty bulls were used for this experiment, of european breeds, being divided in two groups (GI and GII), in GI was administered subcutaneous doses of placebo (NaCl, 0.9%) and in GII was administered rBST 2 times. Five blood collections for evaluation of TAG and cholesterol as energetic metabolism markers, urea, as proteic marker, alkaline phosphatase and phosphorus as minerals markers and aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyltransferase (GGT) as indicators of the hepatic function. The interval between treatment and collections was 14 days. rBST did not influenced the energetic, mineral and proteic markers, except the hepatic enzyme GGT ($P < 0,05$), the same not was observed for AST. These results indicate that the use of rBST in bulls did not affect metabolism, with the evaluated parameters remaining in the physiological range, including GGT enzyme.

Key words: metabolism, bulls, rBST.

Introdução

Estudos relacionados ao efeito da somatotropina (hormônio do crescimento - GH) começaram a ser desenvolvidos próximo ao ano de 1980 com a síntese em larga escala da forma recombinante do hormônio do crescimento (rBST), sendo utilizado para tratamento de desordens do crescimento em humanos ou para a estimulação da produção de leite e carne em animais de produção [1].

O GH está associado com o crescimento e desenvolvimento celular, sistema imune e outros processos, sendo descrito como um agente anabólico [2]. Desempenha também um importante papel no controle do metabolismo e diferenciação celular [3]. Estudos conduzidos com bovinos tratados com rBST demonstraram um aumento na massa muscular e uma diminuição na deposição de gordura [4-5-6-7-8-9-10]. Por estimular a síntese protéica, o hormônio aumenta a retenção de nitrogênio e fósforo para a produção de ATP [4].

A ação do GH é mediada pelo hormônio IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I) que é secretado por inúmeras células mitogênicas, sendo que o fígado é o órgão responsável pela sua maior produção [10]. Além de exercer funções já citadas o GH, participa também dos processos reprodutivos, sendo encontrado receptores nas gônadas masculinas e femininas [11-12-13-14-15-16]. Muitos estudos relacionados às interações entre o metabolismo e o desempenho produtivo dos animais vêm sendo conduzidos com fêmeas [15-17-18] porém, com touros poucos estudos foram desenvolvidos.

As concentrações dos metabólitos sanguíneos representam um indicador imediato da condição metabólica do animal [19]. Sendo assim, o perfil metabólico é uma importante ferramenta para detectar alguns distúrbios metabólicos capazes de gerar prejuízos à saúde animal, fertilidade e a capacidade produtiva do rebanho [20].

A hipótese deste estudo é que a administração de rBST influencia as concentrações sanguíneas de alguns marcadores bioquímicos do metabolismo energético, protéico, mineral e hepático.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis dos marcadores, energéticos (colesterol e triglicerídeos-TAG), protéico (uréia), minerais (fósforo e fosfatase alcalina) e hepáticos (aspartato aminotransferase – AST e gama-glutamilttransferase - GGT) de touros tratados com rBST mantidos em sistema de semi-confinamento.

Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado na central de inseminação artificial ABS/PECPLAN, situada no município de Rosário do Sul, RS durante os meses de fevereiro a abril. Foram utilizados 20 touros adultos de raças predominantemente européias, sendo todos mantidos nas mesmas condições ambientais e nutricionais, estando todos em mesmo regime de coleta de sêmen. A dieta fornecida aos animais era calculada de acordo com as normas do NRC [21] para esta determinada categoria animal.

Aleatoriamente foram formados dois grupos (GI e GII), cada um formado por 10 animais, para que fosse administrado via subcutâneo duas doses de placebo (solução fisiológica, NaCl 0,9%) no GI e 500 mg/animal de rBST (Lactotropin®/Elanco Saúde Animal) no GII na mesma frequência e via de administração. A administração do placebo foi realizada com o objetivo de que os dois grupos fossem submetidos à mesma situação de estresse de aplicação do produto. O intervalo de 14 dias entre as aplicações do rBST foi determinado, considerando que o produto apresenta liberação e ação lenta [2].

Foram realizadas 5 coletas de sangue para a avaliação dos marcadores, energéticos (colesterol e triglicerídeos-TAG), protéico (uréia), minerais (fósforo e

fosfatase alcalina) e hepáticos (AST e GGT) [22-23-24-25-26]. Na Figura 1 está demonstrado o esquema de tratamentos e coletas de sangue realizados neste estudo.

As amostras de sangue foram coletadas de todos os animais no turno da manhã através de punção da veia jugular, sendo divididas em 2 frascos: frasco 1, contendo anticoagulante (EDTA 10g%) na proporção de 12 µL/mL de sangue e frasco 2, sem anticoagulante. Após foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos e divididas em dois tubos tipo *ependorff* previamente identificados, dos quais um foi congelado a -20°C e o outro resfriado a +4°C. A quantificação dos metabólicos foi realizada de acordo com os métodos colorimétricos através de kits reagentes específicos (LABTEST[®], Brasil) com a utilização de espectrofotômetro de luz visível FEMTO 435[®], sendo respeitadas todas as exigências dos protocolos.

As concentrações plasmáticas do colesterol foram determinadas nas amostras de soros congelados (-20°C) e as análises de TAG, assim como o fósforo, fosfatase alcalina e uréia foram realizadas nas amostras de soro mantidas em *ependorff* a ±4 °C. A enzima AST foi determinada em plasma refrigerado e a GGT foi medida nas amostras congeladas. Durante todas as coletas foram realizados avaliação do escore de condição corporal (EC) de todos os animais utilizando a escala numérica de 1 a 5 (sendo 1= magro e 5= gordo), conforme Lowman *et al.* [27], sendo descritas suas frequências.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento GLM num modelo fatorial de efeitos fixos: $Y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + E_{ijk}$, onde: Y_{ijk} é a variável resposta; μ é a média geral; A_i é o efeito do fator tratamento; β_j é o efeito do fator período de coleta; $(A\beta)_{ij}$ é o efeito da interação (tratamento x coleta) e E_{ijk} é o erro aleatório. Para os parâmetros que apresentaram na análise de variância valores de

F significativo ($P < 0,05$), foi aplicado o teste de Tukey (5%) para comparar as médias.

Para prever o efeito do período de coleta sobre os parâmetros metabólicos em cada um dos grupos experimentais foi utilizada análise de regressão polinomial, sendo os modelos escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão ($P < 0,05$) e pelo coeficiente de determinação.

Resultados

Os resultados das médias ($\pm$ EPM) dos marcadores bioquímicos, de acordo com os tratamentos e os dias das coletas são demonstrados na Tabela 1. Verificou-se que a contribuição isolada dos efeitos do tratamento com rBST sobre as médias dos marcadores bioquímicos não foram relevantes ($P > 0,05$), sendo encontrado apenas diferença ($P < 0,05$) para a enzima hepática GGT, em que no GII foram observadas maiores concentrações. Na mesma tabela também pode ser observado através dos valores de P a influência de cada fator (tratamento, coleta e a interação entre os tratamentos e as coletas) ao modelo estatístico.

O efeito do período de coleta foi significativo ($P < 0,05$) para as concentrações de uréia, colesterol, TAG, AST e GGT, enquanto que as concentrações da fosfatase alcalina e fósforo não variaram ao longo do período de coleta.

Foram observadas interações significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e período de coleta nos marcadores bioquímicos uréia, TAG e GGT.

Na Figura 2 são apresentadas as análises de regressão para os diferentes períodos de coleta para predição das concentrações de marcadores bioquímicos em animais tratados ou não com o rBST, cujo P tenha sido $< 0,05$.

Os níveis de uréia do GI, através da equação de regressão, demonstraram

efeito quadrático ($P < 0,05$), já os do GII obtiveram efeito cúbico ($P < 0,05$). Os níveis de TAG e GGT melhor se ajustaram a um modelo cúbico ($P < 0,05$) ainda que os coeficientes de determinação não sejam muito altos. A enzima AST melhor se ajustou a um modelo linear ($P < 0,05$) em ambos os tratamentos.

Em relação ao escore de condição corporal, 90% dos animais mantiveram durante todas as coletas escore de condição corporal 4 e 10% escore de condição corporal 5.

Discussão

Durantes as coletas praticamente todos marcadores bioquímicos constituintes do perfil metabólico mantiveram-se de acordo com os padrões fisiológicos [28-29], apenas os valores de TAG foram superiores e os de fósforo foram considerados abaixo dos padrões normais para a espécie.

As concentrações de uréia, que é um indicador dos níveis protéicos administrados na dieta e do catabolismo protéico [30] não foram diferentes entre os dois grupos (Tabela 1). O rBST possui ação anabólica, ocorrendo diminuição do catabolismo protéico nos animais tratados com este hormônio [10]. Possivelmente este efeito não tenha sido observado nos animais tratados com rBST, de acordo com os índices de uréia, pois os animais estavam em condição metabólica estabilizada sem degradação de proteínas para ser utilizada como fonte energética e por apresentarem alta condição corporal, durante todo o período do experimento.

Ainda que de acordo com os valores fisiológicos ambos os grupos apresentaram maiores concentrações de uréia na coleta do dia 0 (Figura 2). Isto pode estar relacionado a alguma alteração na fonte protéica da dieta já que este marcador é um indicador sensível e imediato da ingestão de proteína [31].

O colesterol, que possui importante função metabólica por ser constituinte das membranas celulares, além de ser precursor dos hormônios esteróides [32] não apresentou diferenças entre os grupos, demonstrando que o rBST não influenciou este marcador. O mesmo pode ser observado em um estudo conduzido por Prado *et al.* [2] com novilhas submetidas à dose única (rBST) ou a cada 14 dias. Da mesma forma, Holzer *et al.* [33], avaliando dois níveis de energia na dieta e dois níveis de rBST, administrados em intervalos de duas semanas, não observaram diferença na concentração de colesterol para os tratamentos que receberam doses de rBST. A variação dos níveis de colesterol durante as coletas, embora não estivessem fora do intervalo fisiológico (80- 120 mg/dL), pode ter sido desencadeada por alguma alteração na fração energética da dieta, não planejada na formulação da dieta e, portanto, não detectada.

Em relação ao TAG não foram observadas diferenças entre os dois grupos, porém, os níveis deste marcador se apresentaram elevados (Tabela 1), tanto no GI quanto no GII. Provavelmente esta elevação possa ter ocorrido pelo momento das coletas em relação ao horário do dia, já que o TAG possui uma grande variação nos seus valores plasmáticos em função do tempo decorrido entre a ingestão de alimento e a coleta de sangue [31]. Isto se deve a produção de quilomícrons logo após uma refeição rica em gordura, podendo resultar em aumento temporário do triacilglicerol plasmático [34].

Em estudos conduzidos com fêmeas foi observado redução dos níveis de triglicerídeos nos animais que receberam o tratamento com rBST [35], o que não foi observado em nosso estudo. A diferença entre as coletas deste marcador também pode ter sido ocasionada pelo momento das coletas, como citado anteriormente.

A fosfatase alcalina que é uma enzima indicativa de distúrbios ósseos

apresenta-se elevada em casos de: osteomalácia, hipertireoidismo, tumor ósseo, deficiência de vitamina D, raquitismo. Neste estudo os valores deste marcador apresentaram-se estabilizados, não sendo influenciado pela ação do rBST. Em pequenos animais esta enzima pode servir para diagnóstico de doenças hepáticas, sendo de pouca importância em doenças hepáticas de ruminantes [31].

O fósforo que possui como principais funções estruturar a matriz óssea, compor as nucleoproteínas e fosfolipídios, não foi influenciado pelo tratamento (Tabela 1), mantendo-se estabilizado durante o estudo. Os resultados em ambos os grupos foram abaixo do intervalo fisiológico para bovinos (2,0-9,6 mg/dL). Segundo Kolb [4] em função do GH estimular a síntese protéica, ocorre aumento da retenção de nitrogênio e fósforo para a produção de ATP, o que pode gerar diminuição na concentração de fósforo na circulação sanguínea, o que não pode ser observado neste estudo, pois a diminuição constatada foi nos dois grupos. Orr *et al.* [36], demonstraram que animais mantidos em condições de estresse apresentam diminuição significativa nas concentrações de fósforo e outros minerais. Provavelmente as baixas concentrações de fósforo neste estudo possa ter sido desencadeada por este fator, já que o experimento foi realizado durante os meses de fevereiro a abril em que os animais foram submetidos a condições climáticas desfavoráveis com altas temperaturas. A redução de fósforo causada por altas temperaturas, também pode ser observada em um estudo conduzido com fêmeas durante o verão [37]. A deficiência de fósforo na dieta seria outra hipótese para que os valores estivessem abaixo do fisiológico, mas durante todo o estudo não foi constatado nenhuma manifestação clínica de deficiência deste mineral, que seriam principalmente a redução do consumo de alimentos, queda de peso e falhas reprodutivas [38]. No caso de distúrbios na mineralização, como na deficiência de

fósforo, os valores da enzima fosfatase alcalina, a qual está associada à formação óssea, estariam elevados [39- 40], o que não foi observado neste estudo.

A enzima hepática AST que esta associada a problemas hepáticos sendo também um indicador de lesões musculares, não apresentou diferenças entre os dois grupos, apenas ocorrendo variação durante as coletas (Tabela 1), mas de acordo com os parâmetros fisiológicos.

A GGT que desempenha função associada às membranas hepáticas especialmente as dos epitélios dos ductos biliares [31], foi diferente entre os dois grupos, sendo observado maiores concentrações no grupo que recebeu o rBST ($P < 0,05$). Por ser uma enzima caracterizada por extrema sensibilidade [41], o aumento nas concentrações do GII poderia ser justificado pela ampliação da função hepática já que o rBST provoca profundas modificações no metabolismo dos lipídeos aumentando a mobilização, a concentração plasmática [42] e a taxa de oxidação [10] de ácidos graxos não esterificados que são utilizados no fígado como via metabólica alternativa [43].

Através das análises de regressão (Figura 2), pode-se observar que os marcadores bioquímicos avaliados apresentaram um comportamento sensível durante as coletas, ocorrendo variações que podem ser visualizadas, por exemplo, pelo efeito cúbico ($P < 0,05$) demonstrado pelos marcadores TAG e GGT em ambos os grupos. Estas oscilações também foram observadas nas concentrações uréia que apresentou efeito quadrático no GI e cúbico no GII ($P < 0,05$). O único marcador que apresentou em ambos os grupos, efeito linear ($P < 0,05$) foi a AST.

De acordo com os resultados, a utilização do rBST não provocou alterações significativas nos marcadores avaliados, sem prejudicar o metabolismo animal, o que é importante para a atividade produtiva e reprodutiva do indivíduo.

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com rBST não modificou os marcadores energéticos, protéico e minerais, apenas influenciando nas concentrações da enzima hepática GGT, o que não ocorreu com a AST. Estes resultados indicam que a utilização do rBST em touros não alterou a homeostasia, pois os parâmetros avaliados mantiveram-se de acordo com os padrões fisiológicos, incluindo a enzima GGT.

Referências bibliográficas

- [1] Sirotkin AV. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. Research Institute of Animal Production 2004; 2: 949- 992.
- [2] Prado IN, Nascimento WG, Negrão JA, Rigolon LP, Schiller SS, Sakuno ML, Pessini GL. Somatotropina Bovina Recombinante (rBST) nos Aspectos Hematológicos e Metabólitos do Sangue de Novilhas (½ Nelore x ½ Red Angus) em Confinamento R. Bras. Zootec. 2003; 32: 465-472.
- [3] Kaiser GG, Sinowatz F, Palma GA. Effects of growth hormone on female reproductive organs. Anatomy, Histology and Embryology 2001; 30: 265–271.
- [4] Kolb E. Fisiologia veterinária. (4.Ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984, pp. 625.
- [5] Enright W J, Quirke JF, Gluckman PD, Breier BH, Kennedy LG, Hart IC, Roche JF, Coert A, ALLEN P. Effects of long-term administration of pituitary-derived bovine growth hormone and estradiol on growth in steers. J. Anim. Sci.1990; 68: 2345-2356.
- [6] Dalke B S, Garber M J, Roeder RA, Kasser T R, Comstock C J, Reeve NA, Schelling G T. Dose response of recombinant bovine somatotropin (rbST) on serum somatotropin and insulin-like growth factor-1 levels in steers. J. Anim. Sci. 1991; 70: 2130-2137.

- [7] Moseley WM, Paulissen JB, Goodwin MC, Alaniz GR, Claflin WH. Recombinant bovine somatotropin improves growth performance in finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 1992; 70: 4122- 4125.
- [8] Preston RL, SJ Bartle, Kasser TR, Day JW, Veenhuizen JJ, CA Baile. Comparative effectiveness of somatotropin and anabolic steroids in feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 1995;73:1038-1047.
- [9] Rumsey TS, Elsasser TH, Kahl S. Roasted soybeans and an estrogenic growth promoter affect growth hormone status and performance of beef steers. *J. Nutr.*, 1996.
- [10] Breier BH. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis Research Centre for Developmental Medicine and Biology, Faculty of Medicine and Health Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand 1999; 17:209-218.
- [11] Schams D, Berisha B, Kosmann M, Einspanier R, Amselgruber WM. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGFbinding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domestic Animal Endocrinology* 1999; 17: 279–285.
- [12] Sirotkin AV. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. *The Veterinary Journal* 2004; 170: 307-317.
- [13] Hull KL, Harvey S. Growth hormone: roles in male reproduction. *Endocrine* 2000a 13: 243–250
- [14] Hull KL, Harvey S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Reviews in Reproduction* 2000 b ;5:175– 182.
- [15] Gong JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 229–241.

- [16] Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gerard N, Mermillod P, Goudet G. Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger Rna expression in equine and porcine species. *Biology of Reproduction* 2003; 69:1013–1022.
- [17] Robinson JJ. Nutrition and reproduction. *Animal Reproduction Science* 1996; 42: 25–34.
- [18] Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle *Animal.Reproduction Science* 2000; 60: 449–457.
- [19] Pambu-Gollah R, Cronje PB, Casey, NH. An evolution for the use of blood metabolite concentrations as indicator of nutritional status in free-ranging indigenous goats. *South Afric. J. Anim. Sci.* 2000; 30: 115-120.
- [20] Payne JM, Payne S. The metabolic profile test. Oxford: Oxford University, 1987, pp; 123-147.
- [21] National Research Council - NRC. Nutrient requirements of beef cattle.7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1998, pp.381.
- [22] Kappel LC, Ingraham RH, Morgan EB, Zeringue L, Wilson D, Babcock DK. Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows. *Am J Vet Res* 1984; 45: 2607–2612.
- [23] Guédon L, Saumande J, Dupron F, Couquet C, Desbals B. Serum cholesterol and triglycerides in postpartum beef cows and their relationship to the resumption of ovulation. *Theriogenology* 1999; 51: 1405–1415.
- [24] Contreras PA. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. UFRGS, 2000, pp.23-30.

- [25] Lago EP, Pires AV, Susin I, Faria VP, Lago LA. Efeito da Condição Corporal ao Parto sobre Alguns Parâmetros do Metabolismo Energético, Produção de Leite e Incidência de Doenças no Pós-Parto de Vacas Leiteiras Rev. bras. Zootec. 2001; 30: 1544-1549.
- [26] Peixoto LA, Brondani O, Nörnberg IL, Restle JL, Alves J, Pazini DCFM, Coradini MT, Santos CVM. Perfil metabólico protéico e taxas de concepção de vacas de corte mantidas em pastagem natural ou suplementadas com farelo de trigo com ou sem uréia. Ciência Rural 2006; 36: 61-70.
- [27] Lowman BG, Scott N, Somerville S. Condition scoring beef cattle. Edingburgh: East of Scotland College of Agriculture (Bulletin 6), 1976, pp.8-39.
- [28] Blood DC, Radostits OMX. Clínica Veterinária (7a. Ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991, pp. 320-370.
- [29] Kaneko J.J. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed. Acad. Press, San Diego. 1997, pp. 932.
- [30] Wittner F, Reyes JM, Opitz H. Determinacion de urea muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. Arch. Med. Vet. 1993; 25: 165-172.
- [31] Gonzáles F H, Silva S C. Introdução a bioquímica clínica veterinária - Porto Alegre, UFRGS, 2003, pp. 67-79.
- [32] Grummer RR, Carroll DJ. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. Journal of Animal Science 1991; 69: 3838-3852.
- [33] Holzer Z, Aharoni Y, Brosh A, Orlov A, Veenhuizen JJ, Kasser TR. The effects of long-term administration of recombinant bovine somatotropin (posilac) and synovex on performance, plasma hormone and amino acid concentration, and

muscle and subcutaneous fat fatty acid composition in holstein-friesian bull calves. J. Anim. Sci. 1999. 77:1422–1430.

[34] Lehninger AL, Nelson, DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica. Editora Sarvier, 2ºed., 1995, pp 126-140.

[35] Lapierre H, Pelletier G, Petitclerc D. Effect of human growth hormone-releasing factor and (or) thyrotropin-releasing factor on growth, carcass composition, diet digestibility, nutrient balance, and plasma constituents in dairy calves. Journal Animal Science 1991; 69: 587-598.

[36] Orr CC. Serum cooper, zinc, calcium and phosphorus concentrations of calves stressed by bovine respiratory disease and infectious bovine rhinotracheitis. J. Anim. Sci. 1990; 68: 2893- 2900.

[37] Vasquez EFA, Herrera APN. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo de vacas mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. Ciência Rural 2003; 33: 743-747.

[38] Underwood EJ. The mineral nutrition of livestock. (2.Ed.) Farnham Royal: CAB. 1981, pp.102-103.

[39] Radostitis OM, Blood DC, Gay CC. *Veterinary Medicine*. 8.ed. London: Bailliere Tindall, 1994, pp. 340-356.

[40] Scott D, Loveridge N, Nicodemo L. Effect of diets varying in nitrogen or phosphorus content on indicators of bone growth in lambs. *Exp. Phys* 1997; 82:193-202.

[41] Gonzáles FH. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. Porto Alegre, UFRGS, 2000, pp. 280-300.

[42] Eiseman JH, Hammond AC, Bauman DE. Effect of bovine growth hormone administration on metabolism of growing Hereford heifers: protein and lipid

metabolism and plasma concentrations of metabolites and hormones. *J. Nutr.* 1986; 116: 2504-2515.

[43] Pamela CC, Harvey RA. Metabolismo dos ácidos graxos e trigliceróis. In: *Bioquímica Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, pp.177-196.

Tabela 1. Médias ($\pm$ EPM) dos marcadores bioquímicos, de acordo com os tratamentos e período das coletas.

Tratamentos	Marcadores Avaliados						
	Uréia (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	TAG (mg/dL)	F.Alcalina (U/L)	Fósforo (mg/dL)	AST (U/L)	GGT (U/L)
Médias de acordo com os grupos							
GI-placebo	19,25 $\pm$ 0,82 ^a	75,43 $\pm$ 2,05 ^a	88,84 $\pm$ 3,78 ^a	11,33 $\pm$ 1,19 ^a	0,97 $\pm$ 0,11 ^a	42,55 $\pm$ 0,46 ^a	21,25 $\pm$ 1,05 ^a
GII-rBST	19,4 $\pm$ 0,78 ^a	80,16 $\pm$ 2,38 ^a	92,47 $\pm$ 4,30 ^a	10,19 $\pm$ 0,69 ^a	0,89 $\pm$ 0,18 ^a	43,37 $\pm$ 0,50 ^a	27,08 $\pm$ 1,01 ^b
Coletas							
Dia 0	25.74 $\pm$ 1.00 ^a	81.11 $\pm$ 3.70 ^{ab}	135.1 $\pm$ 4.56 ^a	10.17 $\pm$ 1.13 ^a	0.62 $\pm$ 0.02 ^a	39.68 $\pm$ 0.36 ^c	26.92 $\pm$ 1.19 ^{ab}
Dia 14	16.98 $\pm$ 0.91 ^b	86.16 $\pm$ 3.80 ^a	74.81 $\pm$ 3.14 ^b	8.28 $\pm$ 1.02 ^a	0.78 $\pm$ 0.03 ^a	40.93 $\pm$ 0.50 ^{bc}	31.70 $\pm$ 1.93 ^a
Dia 28	19.37 $\pm$ 1.11 ^b	77.82 $\pm$ 3.24 ^{ab}	84.65 $\pm$ 4.80 ^b	8.74 $\pm$ 0.94 ^a	0.90 $\pm$ 0.03 ^a	45.89 $\pm$ 0.45 ^a	23.83 $\pm$ 1.60 ^{bc}
Dia 42	17.74 $\pm$ 1.33 ^b	69.57 $\pm$ 3.05 ^b	85.37 $\pm$ 1.38 ^b	12.68 $\pm$ 1.94 ^a	1.49 $\pm$ 0.52 ^a	42.83 $\pm$ 0.82 ^b	19.87 $\pm$ 1.06 ^{bc}
Dia 56	16.78 $\pm$ 0.77 ^b	74.32 $\pm$ 2.99 ^{ab}	73.04 $\pm$ 4.18 ^b	13.93 $\pm$ 2.04 ^a	0.88 $\pm$ 0.04 ^a	45.47 $\pm$ 0.46 ^a	18.79 $\pm$ 1.05 ^c
Valores de P							
Tratamento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,05
Coleta	0,05	0,05	0,05	N.S.	N.S.	0,05	0,05
Tratamento x coleta	0,05	N.S.	0,05	N.S.	N.S.	N.S.	0,05

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

N.S.: não significativo.

Figura 1. Esquema das coletas e tratamentos realizados durante o estudo.

Legenda:

Dia 0: refere-se à primeira coleta de sangue para avaliação dos marcadores metabólicos e aplicação de placebo nos animais do GI e 500 mg/touro de rBST no GII.

Dia 14: realização da segunda coleta de sangue para análise dos marcadores bioquímicos e a última aplicação do placebo no GI e rBST no GII.

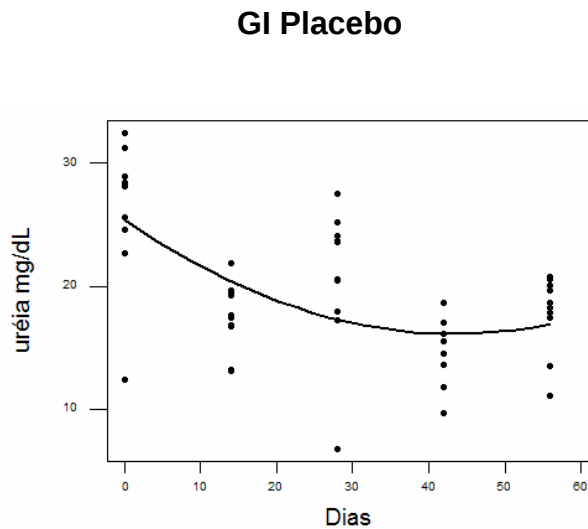
Dia 28: dia em que foi realizado apenas coleta de sangue.

Dia 42: idem ao dia 28.

Dia 56: última coleta de sangue.

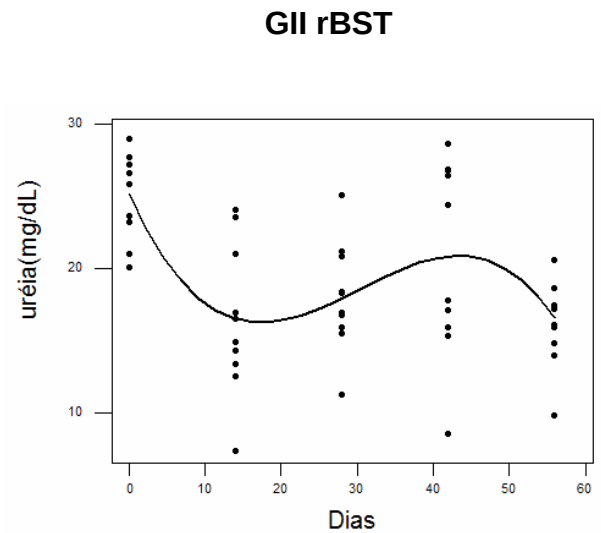


Figura 2. Análises de regressão das concentrações de uréia, TAG, AST e GGT ajustadas em função do período de coleta em cada um dos grupos experimentais. Os gráficos da esquerda representam o GI e os da direita representam o GII



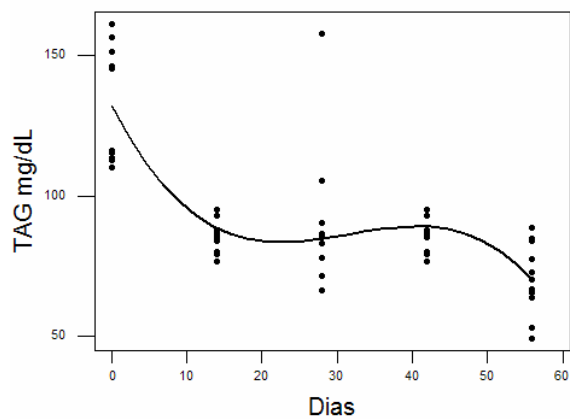
$$R^2 = 34,8 \%$$

$$Y = 25,7256 - 0,588391X + 1,30E-02X^{**2} - 9,54E-05X^{**3}$$



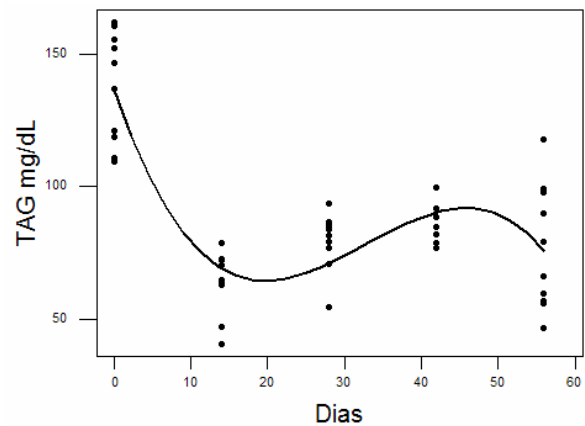
$$R^2 = 36,1\%$$

$$Y = 25,1868 - 1,18802X + 4,80E-02X^{**2} - 5,27E-04X^{**3}$$



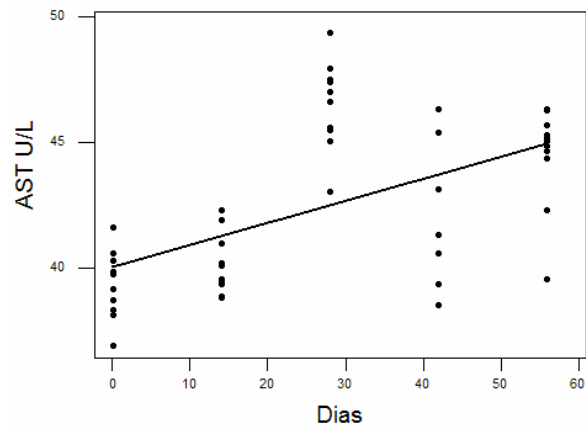
$$R^2 = 71\%$$

$$Y = 136,226 - 8,47021X + 0,306706X^{**2} - 3,12E-03X^{**3}$$



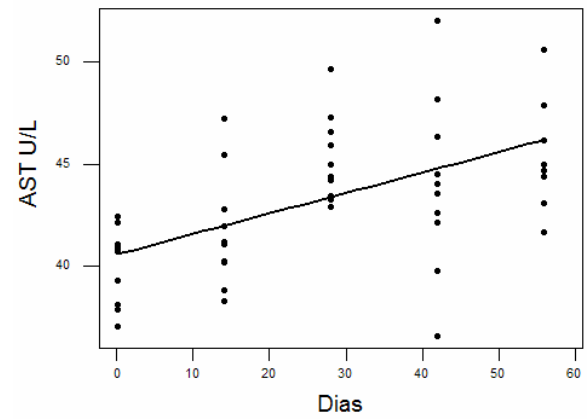
$$R^2 = 63,1 \%$$

$$Y = 132,107 - 5,28491X + 0,182238X^{**2} - 1,92E-03X^{**3}$$

GI Placebo

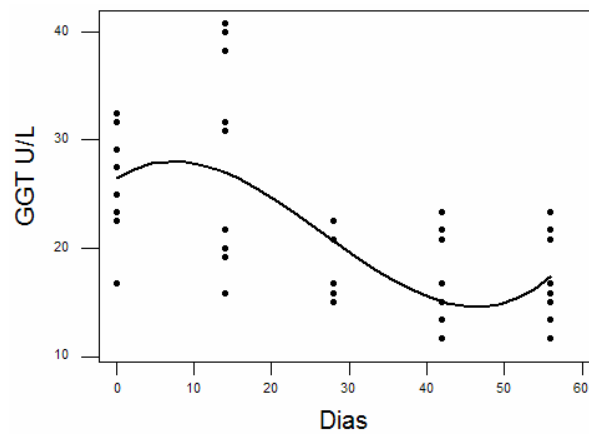
$$R^2 = 29,3 \%$$

$$Y = 40,0866 + 8,73E-02X$$

GII rBST

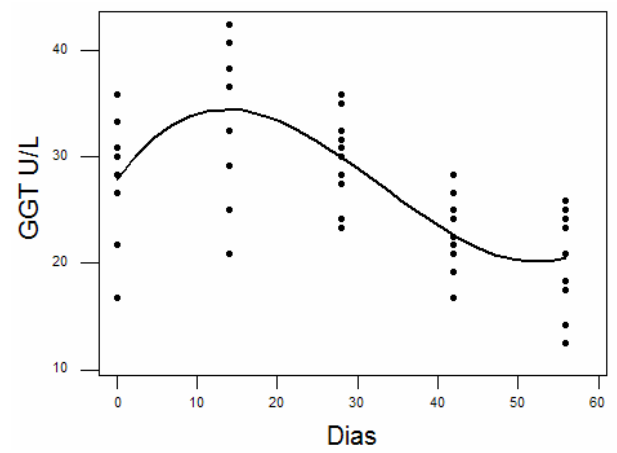
$$R^2 = 31,8 \%$$

$$Y = 40,5672 + 0,100402X$$



$$R^2 = 41,1 \%$$

$$Y = 26,4700 + 0,452000X - 3,61E-02X^{**2} + 4,49E-04X^{**3}$$



$$R^2 = 50,5 \%$$

$$Y = 27,8452 + 1,06179X - 4,91E-02X^{**2} + 4,96E-04X^{**3}$$

ARTIGO 2

Efeito da somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre os níveis de IGF-I, insulina e qualidade de sêmen de touros

Effect of the bovine recombinant somatotropina (rBST) on the levels of IGF-I, insulin
and quality of semen of bulls

Artigo formatado conforme as normas da revista Theriogenology

Resumo

O hormônio do crescimento (GH) além de estar envolvido com o crescimento e desenvolvimento celular, participa também de processos metabólico-hormonais ligados à reprodução. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do rBST sobre os níveis de IGF-I, insulina e sobre a qualidade de sêmen de touros. Este experimento foi realizado na ABS/PECPLAN, situada no município de Rosário do Sul, RS. Foram utilizados 20 touros de raças européias, sendo divididos aleatoriamente em dois grupos (GI e GII). O GI recebeu duas doses com intervalo de 14 dias de placebo e o GII recebeu 500 mg/animal de rBST (Lactotropin®), na mesma frequência e intervalo de aplicação do GI. Para as avaliações hormonais foram realizadas 5 coletas de sangue e para as avaliações de sêmen 6 coletas de sêmen seguidas de congelamento. Nas avaliações do IGF-I foram observadas diferenças ($P < 0,01$) entre os grupos, demonstrando valores superiores no GII, já nas concentrações de insulina não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre estes. Nas avaliações de sêmen do pré-congelamento a motilidade e morfologia espermática não apresentaram diferenças entre os grupos ($P > 0,05$). Em relação às avaliações de sêmen pós-congelamento, foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos na motilidade (GI 50,83 % $\pm$ 1,72, GII 56,25 % $\pm$ 1,56), morfologia e nas avaliações de integridade de membrana por sondas fluorescentes e pelo teste hiposmótico. Os resultados deste estudo permitem concluir que o tratamento com rBST em touros aumenta os níveis de IGF-I, influenciando positivamente a motilidade, a morfologia e integridade de membrana espermática avaliadas no pós-congelamento.

Palavras chave: touros, sêmen, hormônios metabólicos.

Abstract

The growth hormone (GH) beyond being involved with the growth and cellular development, also participates of on metabolic-hormones processes to the reproduction. The objective of this study was to evaluate the effect of rBST on IGF-I, insulin and on semen quality of bulls. This experiment was carried in ABS/PECPLAN, located in Rosário do Sul, RS. Twenty bulls of European breeds have been used, divided in two groups (GI and GII). The GI received two doses of placebo with interval of 14 days and the GII received 500 mg/bull of rBST (Lactotropin®) in the same frequency and interval of GI. For hormonal evaluations 5 blood collections have been carried out and 6 collections for semen freezing evaluations. In IGF-I evaluations differences ($P < 0.01$) between groups have been observed,

showing increase in GII, but no differences ($P > 0,05$) for insulin concentrations between groups have been observed. In the semen evaluations during pay-freezing the motility and morphology had not presented differences between the groups ($P > 0,05$). In relation to the semen evaluations after-freezing, differences had been observed ($P < 0,05$) enter the groups in the motility (GI $50.83\% \pm 1,72$, GII $56.25\% \pm 1,56$), morphology and in the evaluations of integrity of membrane for fluorescent probes and the hiposmótico test. The results of this study show that the treatment with rBST in bulls increase the IGF-I levels, positively influencing the motility, morphology and integrity of sperm membrane in the after-freezing.

Keywords: bull, semen, metabolic hormones.

Introdução

A fertilidade e o mérito genético de um touro possuem impacto superior no desempenho de um rebanho [1], pois o touro é responsável por servir um determinado número de fêmeas, deixando um maior número de descendentes do que uma fêmea [2]. Devido a este fato a fertilidade dos touros é um fator extremamente importante para que o sistema de produção seja eficiente [3].

Esta categoria animal possui importante função no que diz respeito ao melhoramento genético, principalmente quando se utiliza a inseminação artificial [4] que é a biotecnologia mais prática e econômica, quando bem utilizada [5]. Todavia o processo de congelamento da célula espermática provoca diminuição da fertilidade quando comparada com sêmen fresco. Este prejuízo surge da combinação de dois fatores, morte celular e dano na capacidade funcional da célula [6]. Embora o sêmen bovino apresente boas características de congelabilidade, há alterações individuais, em relação à qualidade de sêmen, que não são totalmente conhecidas [7]. O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio pituitário que regula inúmeros mecanismos do crescimento animal, metabolismo de nutrientes além de afetar as funções reprodutivas [8-9], porém com touros poucos trabalhos foram realizados relacionando seu efeito com os processos reprodutivos e metabólicos [10]. Vários tecidos reprodutivos possuem receptores para o GH, dentre eles as células gônadais tais como: células testiculares de Leydig, células da granulosa e da teca ovariana, células do cumulus, útero, placenta, glândula mamária e outros tecidos não reprodutivos [11-12-13-14]. O principal mediador da ação do GH é o IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I), que é um polipeptídeo secretado por todas as células mitogênicas, sendo sintetizado principalmente no fígado

[13-15-16]. Em um estudo conduzido por Schwarz *et al.* [17] com novilhas pode ser observada elevação dos níveis de IGF-I após aplicação exógena do GH.

O GH participa ativamente de processos reprodutivos dos machos como a esteroidogênese e a espermatogênese [18-19-20]. As células de Sertoli são as principais fontes de IGF-I testicular, além disso, receptores de IGF-I foram identificados nas células de Leydig, influenciando no processo de multiplicação e diferenciação das células testiculares [21-22-23-24-25]. Desta forma o GH desempenha uma ação autócrina e parácrina na regulação da função testicular [26]. A hipótese deste estudo é que o tratamento com a forma recombinante do hormônio do crescimento (rBST), influencia as concentrações hormonais e os parâmetros ligados a qualidade de sêmen de touros.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com rBST sobre os níveis de IGF-I, insulina e as características qualitativas de sêmen de touros

Materiais e métodos

Animais e desenho experimental

Este estudo foi realizado nas dependências da central de inseminação artificial ABS/PECPLAN, localizado no município de Rosário do Sul, RS durante os meses de fevereiro a abril. Foram utilizados 20 touros adultos de raças predominantemente européias, mantidos em mesmas condições nutricionais, sanitárias e ambientais. A dieta era calculada de acordo com as normas do NRC [27] para esta determinada categoria animal.

Aleatoriamente foram formados dois grupos (GI e GII) compostos por 10 touros cada. O GI recebeu duas doses com intervalo de 14 dias de placebo (solução fisiológica, NaCl 0,9%) por via subcutânea e o GII recebeu o rBST (somatotropina recombinante bovina) na dosagem de 500mg/animal (Lactotropin®/Elanco Saúde Animal) na mesma frequência e via de administração do GI. Todos animais selecionados para este estudo estavam nas mesmas condições de coleta de sêmen (2 a 3 coletas de sêmen/semana) e com características qualitativas e quantitativas de sêmen de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [28]. O intervalo de 14 dias entre as aplicações do rBST foi determinado, considerando que o produto apresenta liberação e ação lenta [8].

Foram realizadas 5 coletas de sangue e 6 coletas de sêmen para as respectivas avaliações hormonais e seminais. Na Figura 1 está demonstrado o esquema de coletas de sangue e sêmen.

Avaliações hormonais

Os hormônios metabólicos avaliados foram IGF-I e insulina. Para que não fosse alterado o comportamento dos animais e a qualidade do procedimento de coleta de sêmen, as coletas de sangue eram realizadas posteriormente as coletas de sêmen. As amostras de todos os animais foram coletadas através de punção da veia jugular, sendo divididas em 2 frascos: frasco 1, contendo anticoagulante (EDTA 10g%) na proporção de 12 µL/mL de sangue; frasco 2, sem anticoagulante. Após foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos e armazenadas em tubos tipo *eppendorff* previamente identificados, sendo congelados a -70°C.

As avaliações de IGF-I foram realizadas através da avaliação do plasma sanguíneo pelo método radioimunoensaio (RIA) com a utilização de Kits DSL-5600 Active® com extração (DSL, Webster, Texas, EUA). Este procedimento emprega um ensaio imunorradiométrico (IRMA) de dois sítios descrito por Milles *et al.* [29]. O método é não-competitivo e inclui procedimento de extração, no qual o IGF-I é primeiramente separado de suas proteínas ligantes (IGFBP).

As avaliações de insulina foram realizadas através da análise do plasma sanguíneo pelo método imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA) com a utilização dos analisadores de imunoensaio Elecsys Insulin Roche®.

Avaliações de sêmen

Foram realizadas 6 coletas e congelamentos de sêmen dos touros de ambos os grupos. A duração das coletas até o dia 70 (Figura 1) foi programada de acordo com a duração da espermatogênese dos touros (espermatogônia a espermatozóide) que dura em torno 61 dias [30]. O método utilizado para coleta de sêmen foi à vagina artificial, que é rotineiramente usado na central. O diluente utilizado para os congelamentos durante todo experimento, foi o Bioxel® (IMV, França) e as palhetas utilizadas foram de 0,5 mL. As avaliações de sêmen no período pré-congelamento foram as seguintes:

- Motilidade progressiva (percentual células móveis, 0-100%), realizada através do microscópio de contraste de fase com placa aquecedora em aumento de 200 x [31], colocando uma gota de sêmen (diluído em citrato de sódio 2,9%) entre lâmina e lamínula.

- Concentração espermática, realizada através do espectofotômetro (IMV Technologies® Bovine Photometer nº 694), com o objetivo de calcular a concentração espermática de cada palheta de sêmen;

- Morfologia espermática, através do microscópio de contraste de fase [32] em aumento de 1000 vezes. Para esta avaliação foi adicionada uma alíquota do ejaculado suficiente para turvar a solução em um *ependorff* contendo 0,5 µL de formol salina tamponada. Foram contabilizadas 200 células por ejaculado e caracterizados os percentuais de defeitos espermáticos baseadas na metodologia descrita por Rao [33]. Nos resultados são descritas a porcentagem de células normais de acordo com cada grupo.

Para as avaliações pós-congelamento as palhetas foram descongeladas a 37 °C por 30 s, sendo re-suspensas em tubo cônico contendo 10 mL de citrato de sódio 2,9%, previamente aquecido a 37 °C. A descrição das avaliações pós-congelamento seguem abaixo:

- Motilidade e morfologia espermática foram analisados como descritos anteriormente para as avaliações pré-congelamento;

- Teste hiposmótico: esta avaliação foi realizada segundo o protocolo adotado por Revell & Mrode [34] que consiste na utilização de duas soluções com osmolaridades de 100 mOsm/kg (solução hiposmótica) e 290 mOsm/kg (solução isosmótica) para o sêmen. Para o processamento, inicialmente foi realizado a homogeneização de uma amostra de 10 µL de sêmen em 1mL de cada solução (hiposmótica e isosmótica). Após o período de incubação (1 hora) foram contados 200 espermatozóides em microscopia de contraste de fase em aumento de 1.000x, registrando o percentual de espermatozóides com a cauda curvando-se junto à membrana plasmática expandida na solução hiposmótica e na isosmótica. O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HO) foi feito por intermédio da fórmula citada por Melo [35], sendo: $HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste hiposmótico}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste hiposmótico})$.

- Integridade de membrana plasmática por sonda fluorescente: a avaliação foi realizada através das sondas diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), sendo feita com microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozóides em uma mesma lâmina e classificadas

conforme sua coloração em íntegros (espermatozóides corados em verde em toda sua extensão) e lesados (espermatozóides corados em vermelho).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento GLM num modelo fatorial de efeitos fixos: $Y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + E_{ijk}$, onde: Y_{ijk} é a variável resposta; μ é a média geral; A_i é o efeito do fator tratamento; β_j é o efeito do fator período de coleta; $(A\beta)_{ij}$ é o efeito da interação (tratamento x coleta) e E_{ijk} é o erro aleatório. Para os parâmetros que apresentaram na análise de variância valores de F significativos ($P < 0,05$), foi aplicado o teste de Tukey (5%) para comparar as médias.

Para prever o efeito do período de coleta sobre os parâmetros seminais em cada um dos grupos experimentais foi utilizada análise de regressão polinomial, sendo os modelos escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão ($P < 0,05$) e pelo coeficiente de determinação.

Resultados

Avaliações de Sêmen

Na Tabela 1 verifica-se a contribuição isolada dos efeitos do tratamento com placebo (GI) e com o rBST (GII) sobre as médias das avaliações seminais. Na mesma tabela também pode ser observado a contribuição de cada fator ao modelo estatístico.

Observa-se que no período pré-congelamento a motilidade espermática não diferiu entre os grupos, enquanto que no período pós-congelamento os animais tratados com rBST apresentaram uma motilidade 6% superior ao grupo controle ($P < 0,05$). Na avaliação de integridade de membrana sondas fluorescentes também foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,01$) em favor do grupo tratado com rBST (7%) o mesmo ocorrendo no teste hiposmótico que apresentou-se 9% superior no grupo tratado ($P < 0,01$).

Nas avaliações de morfologia durante o pré-congelamento não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos. No entanto, na avaliação pós-congelamento o grupo tratado com rBST apresentou 3,7% mais células normais que o placebo ($P < 0,05$).

Análises hormonais

Na tabela 2 estão demonstrados as médias e o ($\pm$ EPM) do IGF-I e da insulina de acordo com os grupos (GI e GII).

Foram observadas maiores concentrações do marcador IGF-I no grupo tratado com rBST ($P < 0,01$). Também foi observado efeito do período de coleta sobre este marcador ($P < 0,05$). Entretanto os índices de insulina não foram influenciados pelo tratamento nem pelo período de coleta.

Na Figura 2 são apresentadas as equações de regressão para os diferentes períodos de coleta para predição das concentrações de IGF-I em animais tratados ou não com rBST, cujo P tenha sido $< 0,05$. Observa-se que em ambos os grupos os índices de IGF-I melhor se ajustaram a um modelo quadrático ($P < 0,05$) ainda que os coeficientes de determinação não sejam muito altos.

Discussão

A insulina que é um hormônio polipeptídico anabólico, não foi influenciada neste estudo pelo tratamento com o rBST, efeito esse também observado em estudos conduzidos com fêmeas [8-17]. A hipótese de que ocorresse aumento dos níveis de insulina, considera o fato do rBST eleva os níveis de glicose devido ao aumento da gliconeogênese, a partir de precursores como aminoácidos e glicerol [36-37]. Outro aspecto é que em função do GH ser lipolítico, o mesmo provoca elevação da concentração de ácidos graxos não esterificados (NEFA) [37]. Considerando que o aumento do NEFA ocasiona um aumento na secreção de insulina pelas células do pâncreas [38-39-40], a expectativa é que a aplicação de rBST provocasse um aumento dos níveis de insulina, o que não foi observado neste estudo, mesmo que não tenham sido avaliados os níveis de NEFA.

Os níveis de IGF-I avaliados foram diferentes ($P < 0,01$) em relação aos grupos, sendo superior no grupo em que recebeu o rBST (769,81ng/dL $\pm$ 47,51). O mesmo foi observado em trabalhos com vacas [17-41] e com touros jovens [42] submetidos ao tratamento com este hormônio. Em um estudo conduzido por Santos *et al.* [43] avaliando o efeito do tratamento com rBST sobre a apoptose das células testiculares também foi observado aumento nos níveis de IGF-I, sendo obtidos níveis de IGF-I após tratamento (793.33 ng/dL $\pm$ 106.21), similares aos encontrados neste estudo. Mesmo sendo observado diferença entre os grupos (GI e GII), os valores IGF-I foram elevados em ambos os grupos (Figura 2), provavelmente pelas boas condições nutricionais que os animais apresentavam no período das coletas, já que a nutrição esta diretamente relacionada aos índices circulantes de IGF-I, ou seja, quanto melhor o aporte nutricional maiores são os níveis de IGF-I [44-

45-46-45]. Além disso, o IGF-I pode servir como um sinal que traduz o padrão nutricional ao hipotálamo, já que foram encontrados receptores do IGF-I nas células secretoras de GnRH no hipotálamo [48-49].

Em relação às avaliações de motilidade espermática não foi observado efeito do rBST nas avaliações realizadas durante o período pré-congelamento, já no período pós-congelamento foram observados índices superiores no GII. Em um estudo conduzido por Sauerwein *et al.* [4] avaliando o efeito do tratamento com rBST sobre a eficiência reprodutiva de touros também foi observado maiores índices de motilidade pós-congelamento no grupo que recebeu o rBST. Provavelmente esta elevação na motilidade pós-congelamento possa ser atribuída ao aumento nos níveis de IGF-I, já que em um estudo conduzido por Miao *et al.* [50] foi demonstrado efeito direto do IGF-I no espermatozóide, diminuindo a velocidade curvilínea e a amplitude dos movimentos laterais da cabeça espermática, melhorando a motilidade progressiva dos espermatozóides. Outra possibilidade para que o IGF-I possa ter aumentado a motilidade é através do metabolismo, pois o IGF-I aumenta os níveis de glicose e lactato [51].

As avaliações de integridade de membrana plasmática através de sondas fluorescentes foram realizadas, pois esta avaliação não é importante apenas para indicar o metabolismo espermático, mas também para garantir a manutenção da capacidade fertilizante, já que a integridade da membrana parece exercer papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea [5-52-53]. De acordo com os grupos, o GII apresentou maiores índices de células integras (Tabela 1) do que o GI, demonstrando que o rBST influenciou na integridade de membrana espermática. A avaliação do teste hiposmótico foi realizada por se tratar de uma avaliação da integridade funcional da membrana espermática, a qual também está associada diretamente ao metabolismo espermático [54]. Na observação dos espermatozóides, com membrana celular íntegra, a solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares [55]. Com o influxo da água para o interior da célula íntegra, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda [56]. A partir dos resultados foram observados maiores taxas de células integras no GII (Tabela 1), indicando que o rBST influenciou positivamente esta avaliação.

Os mecanismos que o rBST desempenha o seu efeito na célula espermática e na espermatogênese são complexos e envolvem modificações nos receptores das células espermáticas

e no eixo gonadotrófico. Possivelmente as alterações nas características seminais observadas neste estudo, possam ter sido provocadas pela elevação dos níveis de IGF-I após o tratamento com rBST, pois este possui influência na esteroidogênese através do aumento dos receptores de LH nas células de Leydig, gerando aumento dos níveis de testosterona [4-23-57]. A testosterona além de desenvolver as características sexuais secundárias no macho, é responsável pela espermatogênese e por prolongar a vida útil do espermatozóide epididimário, proporcionando condições para que o espermatozóide desenvolva suas habilidade de fertilizar o óvulo no transporte ao longo do epidídimo, envolvendo modificações da integridade funcional do espermatozóide [58]. Além disso, segundo Yoshimura [26] o IGF-I pode melhorar a capacidade das células de Sertoli em responder ao estímulo do FSH, ocasionando melhores condições para que a espermatogênese seja realizada, já que estas células são responsáveis por realizarem a sustentação da espermatogênese através da liberação de proteína ao longo da extensão dos túbulos seminíferos [58]. Conseqüentemente, o IGF-I pode regular não somente a esteroidogênese testicular, mas também a proliferação das células espermáticas em touros [59]. Efeito negativo do tratamento com rBST foi relatado apenas em cães que apresentaram degeneração testicular após longo período de tratamento com altas dosagens do produto [60]. Estudos conduzidos com humanos e roedores comprovaram a influência do GH para que ocorra de forma plena os processos de espermatogênese e o desenvolvimento da função reprodutiva nos machos [18-19-61].

Desta forma com a utilização do rBST, que atua de forma direta e indireta no metabolismo espermático [4], pode-se observar melhora de alguns parâmetros reprodutivos em touros podendo ser uma ferramenta para que os índices de fertilidade dos machos sejam mais elevados.

De acordo com os resultados deste estudo foi demonstrado que o tratamento com rBST em touros, aumentou os níveis de IGF-I nos animais tratados com rBST, influenciando positivamente a motilidade espermática pós-congelamento, a integridade de membrana avaliada por fluorescência e pelo teste hiposmótico, sendo uma alternativa para que a eficiência reprodutiva seja mais adequada.

Referências bibliográficas

- [1] McGowan M. Approach to conducting bull breeding soundness examinations In Practice 2004; 26: 485-491.
- [2] Venter HAW. Importância da maturidade sexual precoce e da idade ao primeiro parto no gado de corte. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1982, pp.453-459.
- [3] Nichi M, Bols PEJ, Züge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, Cortada CNM. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. Theriogenology 2006; 66: 822–828.
- [4] Sauerwein H, Breier BH, Gallaher BW, Götz C, Küfner G, Montag T, Vickers M, Schallenberger E. Growth hormone treatment of breeding bulls used for artificial insemination improves fertilization rates. Domestic Animal Endocrinology 2000; 18: 145–158.
- [5] Gonzales RAF. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. Tese (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2004, pp. 29-45.
- [6] Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 200; 60: 481-492.
- [7] Horn M M, Moraes, JCF, Edelweiss MIA. Análise da expressão de TGF α (Transforming Growth Factor Alpha) nas células germinativas e a frequência de células de sertoli em touros de raças sintéticas com alteração na qualidade seminal Braz. J. vet. Res. anim. Sci. 2006;43: 510-517.
- [8] Prado IN, Nascimento WG, Negrão JA, Rigolon LP, Schiller SS, Sakuno ML, Pessini GL. Somatotropina Bovina Recombinante (rBST) nos Aspectos Hematológicos e Metabólitos do Sangue de Novilhas ($\frac{1}{2}$ Nelore x $\frac{1}{2}$ Red Angus) em Confinamento. R. Bras. Zootec. 2003; 32: 465-472.
- [9] Pivato I. Efeito de diferentes tratamentos hormonais e da nutrição em doadoras de ovócitos na produção de embriões bovinos *in vitro*. Tese (doutorado), Universidade Federal de Pelotas 2001, pp. 19-25.
- [10] Yilmaz A, Davis ME, Simmen, RCM. Reproductive Performance of Bulls Divergently Selected on the Basis of Blood Serum Insulin-Like Growth Factor I Concentration. J. Anim. Sci. 1999; 77: 835–839.
- [11] Hull KL, Harvey S. Growth hormone: roles in male reproduction. Endocrine 2000a 13: 243–250.
- [12] Hull KL, Harvey S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? Reviews in Reproduction 2000 b ;5:175– 182.

- [13] Kaiser, GG, Sinowatz F, Palma GA. Effects of growth hormone on female reproductive organs. *Anatomy, Histology and Embryology* 2001; 30: 265–271.
- [14] Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gerard N, Mermillod P, Goudet G. Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger Rna expression in equine and porcine species. *Biology of Reproduction* 2003; 69: 1013–1022.
- [15] Schams D, Berisha B, Kosmann M, Einspanier R, Amselgruber WM. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals 1999; 17: 279-285.
- [16] Sirotkin AV. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. *The Veterinary Journal* 2004; 170: 307-317.
- [17] Schwarz FJ, Schams D, Ropke R. Effects of somatotropin treatment on growth performance, carcass traits, and the endocrine system in finishing beef heifers. *Journal of Animal Science* 1993; 71: 2721-2731.
- [18] Arsenijevic Y, Wehrenberg WB, Conz A, Eshkol A, Sizonenko PC, Aubert NL. Growth hormone (GH) deprivation induced by passive immunization against rat GH-releasing factor delays sexual maturation in the male rat. *Endocrinology* 1989;124:3050 –3059.
- [19] Spiteri-Grech J, Nieschlag E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res*1990;38:22–27.
- [20] Chandrashekar V, Bartke A, Awoniyi CA, Tsai-morris CH, Dufau ML, Russell LD, Kopchick JJ. Testicular endocrine function in GH receptor gene disrupted mice. *Endocrinology* 2001;142: 3443–3450.
- [21] Ritzen EM. Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. *J Steroid Biochem* 1983; 19:499 –504.
- [22] Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L. 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* 1986;119:1641–1647.
- [23] Lin T. Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. *J Androl* 1995; 16:193–196.

- [24] Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez L, Dieguez C, Casanueva F, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 1999; 161: 211–218.
- [25] Wang G, Hardy MP. Development of Leydig cells in the insulin-like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol Reprod* 2004; 70: 632–639.
- [26] Yoshimura Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Potential relevance to reproductive physiology *Reproductive Medicine and Biology* 2003; 2: 1-24.
- [27] National Research Council - NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1998, pp. 381.
- [28] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA 1998, pp 49.
- [29] Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, Cook JD. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analyt Biochem* 1974; 61: 209-224.
- [30] Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. Department of Animal Sciences Washington States University Research & Technology Park, USA, 1997, pp. 169-186.
- [31] Bearden HJ, Fuquay JW. Semen evaluation. In: Bearden HJ, Fuquay JW 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall (Eds.), *Applied Animal Reproduction* 1997, pp.159-170.
- [32] Garcia O. Características físicas e morfológicas do sêmen de touros de raças zebuínas e européias no Brasil. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 1971 pp. 50.
- [33] Rao AR. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Thesis. Royal Veterinary College of Stockholm 1971, pp. 80.
- [34] Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* 1994; 36: 77-86.
- [35] Melo MIV. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 1999, pp. 46-68.
- [36] Knapp JR, Freetly HC, Reis BL. Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 1992; 75: 1025-1035.

- [37] Breier BH. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis Domestic Animal Endocrinology 1999; 17:209–218.
- [38] Malaisse WJ, Hutton, JC, Kawazu S, Herchulez A, Valverde I, Sener A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. The links between metabolic and cationic events. Diabetologia 1979; 16:331–341.
- [39] Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. Annu. Rev. Biochem 1995; 64: 689–719.
- [40] Schnell S, Schaefer M, Schöfla C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from β -cells through activation of GPR40. Molecular and Cellular Endocrinology 2007; 263: 173–180.
- [41] Bilby CR, Bader JF, Salfen BE, Youngquist RS, Murphy CN, Garverick HA, Crooker BA, Lucy LB MC. Plasma gh, igf-i, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine gh Theriogenology 1998; 1285-1296.
- [42] Macdonald RD, Deaves DR. Testicular Development in Bulls Treated with Recombinant Bovine Somatotropin .J. Anim. Sci. 1993; 71:1540-1545.
- [43] Santos RL, Silva LACM, Ribeiro IAF, Vasconcelos AC, Pesquero JL, Coelho SG, Serakides JR I, Reis SR. Effect of growth hormone and induced igf-i release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. Theriogenology 1998; 51: 975-984.
- [44] Breier BH, Bass JJ, Butler JH, Gluckman PD. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor I. J Endocrinol 1986; 15:111-209.
- [45] Granger AL, Wyatt WE, Craig WM, Thompson Jr DL, Hembry FG. Effects of breed and wintering diet on growth, puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor I in heifers. Domestic Anim Endocrinol 1989; 6: 253– 262.
- [46] Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. Domestic Anim Endocrinol 1996; 13:325–338.
- [47] Hornick JL, Van Eenae C, Diez M, Minet V, Istasse L. Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue bulls. II. Plasma metabolites and hormones. J Anim Sci 1998; 76: 260–271.

- [48] Bohannon N, Corp E, Wilcox B, Figlewicz D, Dorsa D, Baskin D. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in the median eminence of the brain and their modulation by food restriction. *Endocrinology* 1988; 122: 1940–1947.
- [49] Miller BH, Gore AC. Alterations in hypothalamic insulin-like growth factor-I and its associations with gonadotropin releasing hormone neurones during reproductive development and ageing. *J Neuroendocrinol* 2001;13:728–736.
- [50] Miao ZR, Lin TK, Bongso TA, Zhou X, Cohen P, Lee KO. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. *Clin Endocrinol* 1998; 49:235–239.
- [51] Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.* 1996; 76: 1005–1026.
- [52] Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membrane. *Theroigenology* 1992; 38: 209-222.
- [53] Souza FF. Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino. Botucatu, 97p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, 2003, pp. 35-38.
- [54] Spittaler PJ, Tyler JPP. Further evaluation of a simple test for determining the integrity os spermatozoal membrane. *Clin. Reprod. Fertil.* 1985;3:187-190.
- [55] Santos SEC, Vannucchi CI, Satzinger S, Visintin JA. Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2001; 25: 472-473.
- [56] Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Zaneveld LJD. The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch. Androl.* 1992; 29: 105-116.
- [57] Spiteri-Grech J, Nieschlag E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res* 1992;38:22–27.
- [58] Hafez B, Hafez ESE. *Reprodução Animal 7º edição.* (Ed.) Manole, SP, 2004, pp.97-110.
- [59] Soder O, Bang P, Wahab A, Parvinen M. Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology* 1992; 131:2344–2350.
- [60] Sjogren I, Jonsson M, Madej A, Johansson HE, Ploen L. Effects of very high doses of human growth hormone (hGH) on the male reproductive system in the dog. *Andrologia* 1998; 30: 37- 42.
- [61] Laron Z. Laron-type dwarfism, hereditary somatomedin deficiency. A review. *Adv Int Med Ped* 1984; 51: 117–140.

Tabela 1. Efeito das aplicações do rBST (GII) e do placebo (GI) sobre as características espermáticas (Médias $\pm$ erro padrão)

Avaliações de Sêmen	Grupo I	Grupo II	Probabilidade		
	Placebo	rBST	Tratamento	coleta	Tratamento x coleta
Motilidade Pré (%)	68,55 $\pm$ 0,99 ^a	67,25 $\pm$ 1,23 ^a	NS	NS	NS
Motilidade Pós (%)	50,83 $\pm$ 1,72 ^b	56,25 $\pm$ 1,56 ^{a *}	0,05	NS	NS
Integridade de membrana (%)	42,45 $\pm$ 1,15 ^b	49,48 $\pm$ 1,12 ^{a **}	0,01	NS	NS
Teste hiposmótico (%)	12, 31 $\pm$ 0,78 ^b	21,15 $\pm$ 1,00 ^{a **}	0,01	NS	0,05
Morfol. Pré (% cel. Normais)	80,76 $\pm$ 1,10 ^a	82,96 $\pm$ 1,28 ^a	NS	NS	NS
Morfol. Pós (% cel. Normais)	77,23 $\pm$ 1,27 ^b	80,95 $\pm$ 0,84 ^{a*}	0,05	NS	NS

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey

* P < 0,05, ** P < 0,01.

NS: não significativo

Tabela 2. Efeito da utilização de rBST sobre os índices de IGF-I e da insulina de acordo com os tratamentos com placebo (GI) e rBST (GII) (médias $\pm$ erro padrão).

Hormônios metabólicos	Grupo I Placebo	Grupo II rBST
IGF-I ng/dL	619,62 $\pm$ 38,24 ^b	769,81 $\pm$ 47,51 ^a
Insulina μ U/mL	0,74 $\pm$ 0,09 ^a	0,95 $\pm$ 0,14 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste GLM e Tukey ($P < 0,01$).

Figura 1. Esquema das atividades realizadas durante o estudo.

Legenda:

Dia 0: Refere-se ao primeiro dia de coleta e congelamento de sêmen e coleta de sangue para as avaliações hormonais. Também foi realizado neste dia a primeira aplicação de placebo no GI e rBST no GII.

Dia 14: Dia em que foi realizado a segunda coleta e congelamento de sêmen e coleta de sangue. Neste mesmo dia foi realizado a última aplicação de placebo no GI e rBST no GII.

Dia 28: Foi realizado coleta e congelamento de sêmen seguido de coleta de sangue para as respectivas análises hormonais.

Dia 42: Idem ao dia 28

Dia 56: Neste dia foi realizada a coleta e o congelamento de sêmen e a última coleta de sangue.

Dia 70: Neste dia foram realizados apenas coleta e congelamento de sêmen de ambos os grupos.

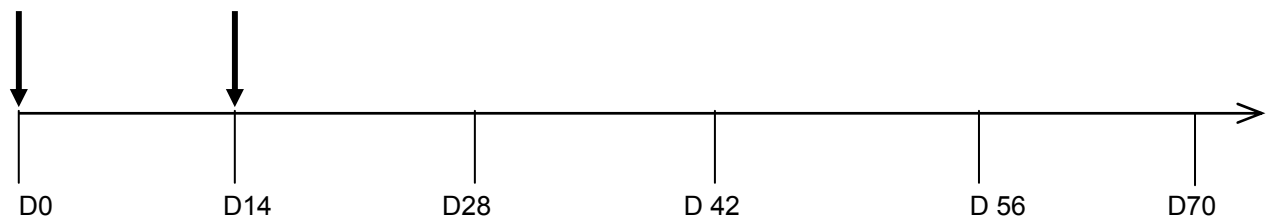
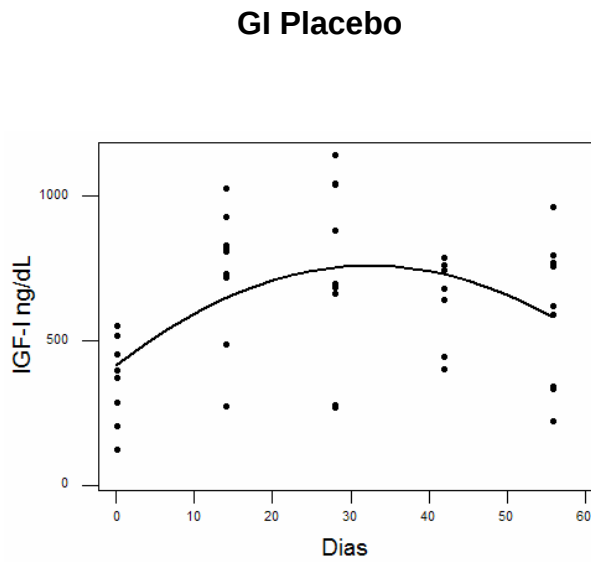
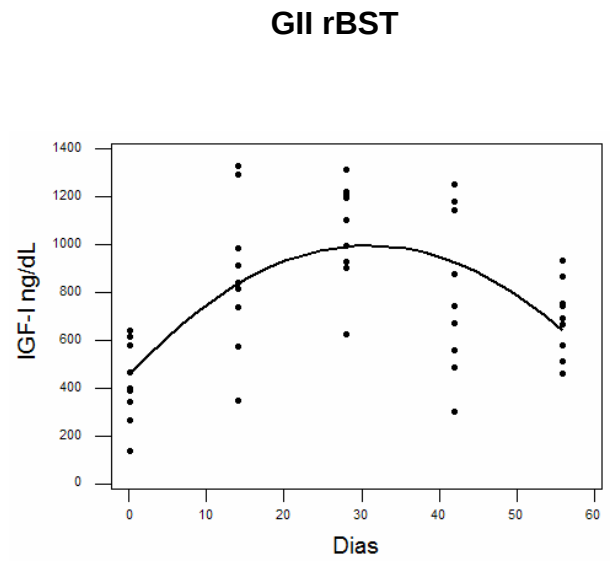


Figura 2. Análise de regressão das concentrações de IGF-I ajustadas em função do período de coleta em cada um dos grupos experimentais. Os gráficos da esquerda representam o GI (placebo) e os da direita representam o GII (rBST).



$$R^2 = 22,6 \%$$

$$Y = 413,097 + 21,1644X - 0,325459X^{**2}$$



$$R^2 = 39,2 \%$$

$$Y = 455,264 + 35,0740X - 0,567623X^{**2}$$

CONCLUSÕES GERAIS

Através deste estudo pode-se concluir que o tratamento com rBST influenciou positivamente nas seguintes características de sêmen avaliadas no período pós-congelamento: motilidade espermática, morfologia espermática e a integridade de membrana plasmática por sondas fluorescentes e pelo choque hiposmótico. Também pode-se observar que o rBST, através das avaliações dos marcadores metabólicos, não provocou alterações no metabolismo energético, protéico, mineral e hepático dos touros, pois as concentrações dos marcadores estavam de acordo com os parâmetros fisiológicos, incluindo a enzima hepática gama-glutamyltransferase (GGT).

Portanto, ainda que outros estudos devam ser realizados considerando diferentes doses e intervalos entre aplicações, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que duas aplicações do rBST (500mg/animal) pode ser utilizado como um tratamento para maximizar as características de qualidade sêmen de touros sem que haja prejuízo ao equilíbrio metabólico do organismo animal.

APÊNDICE

ARTIGO 3

Avaliação do perfil metabólico de touros em diferentes fases do ciclo reprodutivo

Evaluation of the metabolic profile of bulls in different phases of the reproductive
cycle

Formatado conforme as normas da revista Brazilian Journal of Veterinary Research
and Animal Science (USP)

Submetido: março/2007

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE TOUROS EM DIFERENTES FASES DO CICLO REPRODUTIVO

Os touros compõem uma importante categoria animal nos sistemas de produção ligados à pecuária, sendo responsáveis por uma considerável parcela do melhoramento genético de um rebanho. Porém, poucos estudos relacionados às condições metabólicas desta categoria vêm sendo conduzidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil metabólico de touros em três períodos distintos do ciclo reprodutivo, sendo antes da estação reprodutiva, durante e após a estação reprodutiva. Este experimento foi conduzido em uma propriedade da região Sul do Rio Grande do Sul com 23 touros. Os marcadores bioquímicos utilizados para avaliar o perfil metabólico foram os seguintes: glicose, colesterol, para determinar o perfil energético; albumina, uréia, como marcadores protéicos e a enzima aspartato aminotransferase (AST) como indicador da função hepática. Os resultados demonstraram que houve diferença ($p < 0,05$) de todos marcadores metabólicos avaliados durante os diferentes períodos do ciclo produtivo, indicando que houve variação na disponibilidade de alimento, possivelmente capaz de gerar perdas produtivas e reprodutivas que podem ser solucionadas com suplementação protéica ou melhoramento do campo nativo.

PALAVRAS- CHAVE: Touros. Perfil metabólico.

SUMMARY

EVALUATION OF THE METABOLIC PROFILE OF BULLS IN DIFFERENT PHASES OF THE REPRODUCTIVE CYCLE

Bulls are an important category in cattle production systems, being responsible for a considerable part of genetic improvement in a herd. However, few studies about the metabolic conditions of this category have been done. The objective of this study was to evaluate the metabolic profile of bulls in three different phases of the reproductive cycle, that are, before, during and after the breeding season. This study was conducted with 23 bulls, in a farm in southern Rio Grande do Sul. The biochemical markers used for the evaluations were: glucose and cholesterol, to determine energetic profile; albumin and urea to determine protein profile and enzyme aspartate aminotransferase (AST) as an indicator of liver functionality. There was a difference ($p < 0,05$) in all metabolic markers evaluated during the different phases of the productive cycle, showing that there was a variation in food availability, which could lead to productive and reproductive losses. This could be improved by protein supplementation and pasture improvement.

KEY- WORDS: Bulls. Metabolic profile.

INTRODUÇÃO

Nos sistemas de cria e ciclo completo, os touros compõem uma importante categoria, seja para utilização em programas de inseminação artificial ou em sistema de monta natural¹. Trata-se de uma categoria animal que possui efeito direto no melhoramento genético de um rebanho, já que um touro é responsável por servir um determinado número de fêmeas, dependendo do manejo adotado na propriedade, deixando um maior número de descendentes do que uma fêmea².

Dentre os inúmeros fatores que afetam o desempenho reprodutivo de bovinos, a nutrição é um dos fatores que tem o maior impacto, tendo influência direta na liberação de hormônios gonadotróficos como o LH e o FSH³. Inúmeras pesquisas têm demonstrado que o estado nutricional e metabólico do animal influencia as suas funções reprodutivas^{4,5}.

Em sistemas de produção baseados em campo nativo um dos principais problemas encontrados é a estacionalidade de produção desse recurso, sendo causado principalmente, pelas variações climáticas, o que pode determinar ineficiência nos índices produtivos^{6,7}. Segundo González⁸ janeiro e junho seriam os meses com maior deficiência de substratos protéicos na dieta, sendo maior em junho. Lobato⁷ relata que o fator mais limitante na produção pecuária é a deficiência nutricional do campo nativo no período hibernar, aliado a ausência de práticas de manejo que permitiriam uma melhor e mais eficiente utilização do mesmo.

Para a avaliação do perfil metabólico considerando os níveis dos marcadores bioquímicos e suas possíveis interações no desempenho produtivo e reprodutivo podem ser avaliados, a glicose e o colesterol como marcadores energéticos, uréia e albumina protéicos e a enzima aspartato aminotransferase (AST) como marcador da função hepática^{6, 9, 10, 11, 12}. Tais avaliações permitem avaliar o ingresso, egresso e a metabolização dos nutrientes nos tecidos animais^{6, 13}. Normalmente a estação reprodutiva no Rio Grande do Sul é programada nos meses em que a oferta alimentar é mais adequada havendo maior disponibilidade de forragem no campo nativo, de maneira que o início da estação reprodutiva seja programado para o final da primavera e o término no final do verão¹⁴. Outro motivo para que seja definido este período de estação reprodutiva é para que coincidam os nascimentos nas épocas de melhor oferta alimentar determinando melhores condições para que a vaca crie o terneiro e possa ter condições de repetir cria¹⁵. Em fêmeas muitas interações entre metabolismo e reprodução, bem como o estudo do perfil metabólico já foram estudadas, porém em touros existem poucos estudos correlacionando estas interações.

A hipótese deste estudo é que existam variações nos marcadores bioquímicos durante os três períodos distintos do ciclo reprodutivo, ou seja, no período pré estação reprodutiva, durante e após a estação reprodutiva.

Desta forma, o objetivo deste experimento foi avaliar o perfil metabólico de touros mantidos em campo nativo, durante três períodos distintos do ciclo reprodutivo, em que a oferta alimentar e a atividade reprodutiva desempenhada pelos animais são distintas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Santa Vitória do Palmar, RS, com 23 touros de diferentes raças mantidos em campo nativo, sendo 8 Aberdeen Angus, 3 Red Angus, 6 Hereford e 6 Limousin. Foi realizado ao início deste estudo o exame andrológico de todos os touros, a fim de determinar que animais com alterações clínico reprodutivas não fossem incluídos no experimento¹⁶.

A avaliação do perfil metabólico foi realizada em três períodos, sendo definido como período I, II e III, referente ao período pré-estação, durante a estação e após estação reprodutiva, respectivamente. As avaliações nestas três épocas foram realizadas com objetivo de contemplar diferentes ofertas alimentares e, ainda, avaliar o efeito das diferentes atividades, físicas e comportamentais, as quais os reprodutores foram submetidos nos diferentes períodos. Durante as três coletas também foram realizadas avaliação do escore de condição corporal de todos os animais, utilizando a escala de 1 a 5 (sendo 1= magro e 5= gordo), conforme Lowman et al.¹⁷. Para esta análise os animais foram categorizados em dois grupos: condição corporal menor ou igual a 3 e maior que 3. A definição dos intervalos das coletas foi organizada de acordo com o manejo adotado na propriedade, na qual a duração da estação reprodutiva foi de 5 meses, compreendendo os meses de dezembro a abril.

As coletas de sangue para avaliação do perfil metabólico foram realizadas nos seguintes meses: setembro correspondendo ao período pré-estação reprodutiva, fevereiro sendo referente ao período de monta e no mês de junho contemplando o período pós estação. As amostras de sangue foram coletadas de todos os animais através de punção da veia jugular, sendo divididas em 3 frascos: frasco 1, contendo anticoagulante (EDTA 10g%) na proporção de 12 µL/mL de sangue; frasco 2, contendo EDTA 10g% e inibidor de via glicolítica (KF 12%) na proporção de 12 µL/mL e 16 µL/mL de sangue, respectivamente; frasco 3, sem anticoagulante. Após foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos e divididas em dois tubos tipo *ependorff* previamente identificados, dos quais um foi congelado a -20°C e o outro resfriado a +4°C. A quantificação dos metabólicos foi realizada de acordo com os métodos colorimétricos através de kits reagentes específicos (LABTEST®, Brasil) com a utilização de espectrofotômetro de luz visível FEMTO 435®. Todas avaliações realizadas, incluindo exame andrológico e análise do perfil metabólico, foram realizadas por técnicos previamente treinados.

O perfil energético foi determinado a partir das concentrações plasmáticas de glicose (método da glicose oxidase), nas amostras de plasma contendo fluoreto (KF 12%) armazenadas nos *ependorff* a ± 4 °C, já o

colesterol foi determinado (técnica de colesterol oxidase) em amostras de soros congelados (-20°C). A determinação do perfil protéico foi realizado através das concentrações de albumina (técnica do verde de bromocresol) e de uréia (técnica da urease) em soro refrigerado. A enzima AST foi determinada (técnica de Reitman e Frankel) em plasma refrigerado.

As variáveis contínuas, que são os resultados de cada marcador bioquímico, foram analisadas por análise de variância e comparação entre médias de acordo com Teste de Tukey HSD ($p < 0,05$) e a condição corporal que é uma variáveis categóricas, foi analisadas pelo teste de Qui-quadrado e Exato de *Fischer* utilizando o *software Statistix 8 for Windows*¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as três fases do ciclo reprodutivo, embora as avaliações metabólicas de glicose, colesterol, albumina, uréia e AST estivessem de acordo com os padrões fisiológicos para a espécie bovina¹⁹, foram observadas diferenças nas suas concentrações. Os valores médios encontrados para cada marcador durante os três períodos, estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Concentrações médias ($\pm$ erro padrão) dos marcadores bioquímicos avaliados durante os três diferentes períodos.

Marcadores Bioquímicos	Período I	Período II	Período III
Glicose mg/dL	31.907 $\pm$ 2,63 ^b	28.013 $\pm$ 1,85 ^b	47.523 $\pm$ 1,71 ^a
Albumina mg/dL	2.1613 $\pm$ 0,04 ^a	1.6515 $\pm$ 0,04 ^b	1.7485 $\pm$ 0,05 ^b
Uréia mg/dL	30.140 $\pm$ 0,96 ^a	11.951 $\pm$ 0,74 ^c	19.189 $\pm$ 0,71 ^b
Colesterol mg/dL	106.27 $\pm$ 5,64 ^{ab}	112.78 $\pm$ 4,83 ^a	89.87 $\pm$ 3,80 ^b
AST UI/L	41.022 $\pm$ 0,60 ^c	45.836 $\pm$ 0,69 ^b	49.434 $\pm$ 0,66 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Os níveis de glicose durante as duas primeiras coletas mantiveram-se estabilizados, sendo que na última coleta a sua concentração apresentou-se elevada ($p < 0,05$). Possivelmente, esta elevação tenha sido causada pela distância percorrida pelos animais até o local de contenção, para que fossem realizados os procedimentos de coleta de sangue. Outro ponto a ser considerado é que nas outras duas coletas os animais foram trazidos até ao local de contenção, em média, 18 horas antes da coleta de sangue, proporcionando que a maior demanda energética ocasionada pela locomoção fosse minimizada, normalizando os valores deste marcador. Isto se deve ao fato da glicose ser um marcador muito sensível ao estresse e o organismo animal possui vários mecanismos para que seus níveis mantenham-se estabilizados¹⁹. Condição de hipoglicemia somente será observada em condições de severo balanço energético negativo⁸, o que não foi observado nestes animais nos diferentes períodos.

A albumina, que é a principal proteína plasmática, sendo responsável por 80% da osmolaridade do plasma sanguíneo é um dos marcadores bioquímicos do perfil protéico. A sua concentração pode ser influenciada pelo funcionamento hepático, a disponibilidade de aminoácidos e perdas durante doenças, principalmente em parasitismos gastrointestinais²⁰. De acordo com os resultados (tabela 1), mesmo sendo um marcador estável, a concentração de albumina foi maior no período pré-estação ($p < 0,05$), possivelmente pelo melhor aporte protéico na dieta, já que nos outros dois períodos a concentração reduziu e se manteve estável. Segundo Payne & Payne¹³ para se detectar mudanças significativas na concentração sérica de albumina é necessário o período de um mês, devido à baixa velocidade de síntese e de degradação desta proteína em ruminantes, fato que pode ser observado durante os diferentes períodos de coleta (tabela 1).

A uréia também é um indicador do nível protéico administrado na dieta e sua concentração é proporcional à quantidade de amônia produzida no rúmen²¹. Em relação aos valores de uréia (tabela 1), pode-se observar resultados superiores no período I em relação aos outros dois períodos ($p < 0,05$), provavelmente pelo melhor nível protéico na dieta, já que este marcador está diretamente relacionado ao nível de degradação protéica, ou seja, serão encontrados valores altos de uréia em situações de excesso de proteína na dieta ou em situações de grave balanço energético negativo em que esteja ocorrendo degradação protéica como fonte de energia²², o que não foi observado neste caso. No período II a queda mais acentuada nos valores de uréia (tabela 1) pode ser justificada pelo aumento na atividade desempenhada pelos animais, já que este período compreende o período de monta com gasto de energia, associado à queda na qualidade da dieta, principalmente em relação à fonte protéica^{23,24}, o que também pode ser observado pela redução dos níveis de albumina. De modo geral a uréia é um indicador sensível e imediato da ingestão de proteína, enquanto que a albumina é um indicador mais estável, ocorrendo queda nas suas concentrações somente em situações de longos períodos de déficit protéico na dieta²², como podemos verificar nos resultados, ocorrendo uma maior variação nos níveis de uréia em relação à albumina, durante os três períodos.

Os níveis de colesterol, que é o precursor dos hormônios esteróides²⁵, diferiram numericamente nos dois últimos períodos em relação ao período I (tabela 1), sendo encontrado a concentração mais baixa no período III, possivelmente pela baixa disponibilidade de alimentos ricos em energia. Considerando que machos com baixos níveis energéticos na dieta podem apresentar diminuição nos níveis de testosterona plasmática²⁶, os níveis observados poderão influenciar a fertilidade destes animais. Os resultados encontrados no período II (estação reprodutiva) demonstraram aumento concentração de colesterol contradizendo um trabalho conduzido com fêmeas por Talavera et al.²⁷, que observou redução dos níveis de colesterol, pela manutenção dos níveis de

progesterona pelo corpo lúteo, durante o período de maior atividade luteal (diestro) do ciclo estral. Já neste estudo, durante o período de estação reprodutiva em que possivelmente ocorreria maior síntese de hormônio esteróide e, conseqüentemente, diminuição de colesterol, não foi observada tal redução nos seus níveis.

Em relação à enzima hepática AST, que é uma enzima indicadora da função dos hepatócitos, foi observada variação entre as coletas ($p < 0,05$) demonstrando um aumento gradativo na concentração (tabela 1), mas de acordo com os padrões fisiológicos. O aumento gradativo dos níveis dos marcadores provavelmente devem ter sido desencadeados pela diminuição na qualidade da dieta e, conseqüentemente, aumento da função hepática, principalmente no período III com o aumento da metabolização da albumina, já que foi observado decréscimo na sua concentração em relação ao período I. A importância do monitoramento da função hepática é justificada por este órgão participar de atividades metabólicas vitais, incluindo a atividade reprodutiva, sendo um dos principais órgãos produtores de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I), que possui efeito direto na fertilidade dos machos²⁸.

Em relação à condição corporal, que é um dos indicadores de reserva energética dos animais²⁹, não foi encontrado diferença significativa entre os três períodos distintos (tabela 2) demonstrando que a condição corporal manteve-se estabilizada. Dos animais incluídos na categoria ≤ 3 , nenhum animal apresentou condição corporal menor que 2,5 e na categoria > 3 o maior escore encontrado foi 4,0. Poucos estudos relacionando condição corporal, fertilidade e à condição metabólica de touros foram desenvolvidos. Já em fêmeas foram realizados estudos demonstrando que vacas com baixa condição corporal apresentaram queda na taxa de prenhez, maior intervalo entre partos e maior incidência de transtornos metabólicos^{13, 30, 31, 32}.

Tabela 2: Valores das condições corporais avaliadas nos três diferentes períodos.

Categorização	Período I (n=22)	Período II (n=23)	Período III (n=21)
Condição Corporal			
> 3	52,2 % (n=12)	52,2% (n=12)	42,9% (n=9)
≤ 3	47,8% (n=11)	47,8% (n=11)	57,1% (n=12)

Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) teste de Qui-Quadrado.

Neste estudo pode ser observado que as alterações nos marcadores metabólicos avaliados não foram suficientes para que ocorressem alterações na estrutura corporal dos animais, já que não houve diferença nos escores corporais durante os períodos.

As diferenças encontradas nos marcadores bioquímicos avaliados, possivelmente foram causadas pela diferença na oferta alimentar nos distintos períodos, o que pode gerar prejuízos nos índices produtivos e reprodutivos, sugerindo que seja realizado um planejamento nutricional para os touros com a utilização de soluções alimentares tais como, suplementação protéica ou melhoramento do campo nativo³³.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo pode-se constatar que ocorreram variações de todos marcadores bioquímicos avaliados durante os diferentes períodos do ciclo reprodutivo de touros mantidos em campo nativo, mesmo que de acordo com os padrões fisiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NICH, M.; BOLS, P.E.J.; ZÜGE, R.M.; BARNABE, V.H.; GOOVAERTS, I.G.F.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v.66, p.822–828, 2006.
2. VENTER, H.A.W. Importância da maturidade sexual precoce e da idade ao primeiro parto no gado de corte. Belo Horizonte, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, v.82, p.453-459, 1982.
3. BRITO, L.F.C.; BARTH, A. D.; RAWLINGS, N. C.; WILDE ,R.E.; CREWS, J.R.; DENNY, H.; MIR PRIYA, S.; KASTELIC, J.P. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, 2006. Disponível em: <http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/dae>. Acesso em: 4 out. 2006.
4. HAMMOND, J. The physiology of reproduction in the cow. **Cambridge University Press**, London, 1972, p. 35-70.
5. ROBINSON, J.J. Nutrition and reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.25–34, 1996.
6. CONTRERAS, P.A. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLEZ, F.H.D. et al. (Eds). **Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, 2000, p.23-30.
7. LOBATO, J. F. P. Pastagens melhoradas e suplementação alimentar no comportamento reprodutivo de vacas de corte primíparas. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.27, n.1, p.47-53, 1998.
8. GONZALEZ, F.H.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D. et al. (Eds). **Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p.28-45.
9. GUÉDON, L.; SAUMANDE, J.; DUPRON, F.; COUQUET, C.; DESBALS, B. Serum cholesterol and triglycerides in postpartum beef cows and their relationship to the resumption of ovulation. **Theriogenology**, v.51, p.1405–1415, 1999.

10. KAPPEL, L.C.; INGRAHAM, R.H.; MORGAN, E.B.; ZERINGUE, L.; WILSON, D.; BABCOCK, D.K. Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.2607–2612, 1984.
11. LAGO, E. P.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; FARIA, V. P.; LAGO, L. A. Efeito da condição corporal ao parto sobre alguns parâmetros do metabolismo energético, produção de leite e incidência de doenças no pós-parto de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v.30, n.5, p.1544-1549, 2001.
12. PEIXOTO, L. A. O.; BRONDANI, I. L.; NÖRNBERG, J. L.; RESTLE, J.; ALVES, D. C.; PAZINI, F. M.; CORADINI, M. T.; SANTOS, C. V. M. Perfil metabólico protéico e taxas de concepção de vacas de corte mantidas em pastagem natural ou suplementadas com farelo de trigo com ou sem uréia. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1873-1877, 2006.
13. PAYNE, J.M.; PAYNE, S. **The metabolic profile test**. Oxford: University, 1987, p.170.
14. SOUZA, R.M.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; LISTON, M.A.; ANTONIAZZI, A.; CECIM, M. Perfil protéico e eficiência reprodutiva de vacas de corte em lactação suplementadas com uréia no verão. **Archives of Veterinary Science** v.9, n.2, p.89-93, 2004.
15. SILVA, A.W.L. **Taxas de reconcepção e intervalo parto-concepção influenciados pela sub-época e mês de parição de vacas de corte**, 1989. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UFRGS, Porto Alegre, RS.
16. MORAES, J.C.F. Predição da fertilidade de touros empregados em monta natural. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte, 1995, v.1, p.287.
17. LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.; SOMERVILLE, S. Condition scoring beef cattle. **Edinburgh: East of Scotland College of Agriculture (Bulletin 6)**, p.8, 1976.
18. STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee. FL. 2003.
19. KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. Acad. Press, San Diego, 1997. 932 p.
20. ROWLANDS, G. J., A review of variations in the concentrations of metabolites in the blood of beef and dairy cattle associated with pathology, nutrition and disease, with particular reference to the interpretation of metabolic profiles. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.35, p.172-235, 1980.
21. WITTNER, F.; REYES, J. M.; OPITZ, H. Determinacion de úrea muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.25, p.165-172, 1993.
22. GONZÁLES, F. H.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária- Porto Alegre, UFRGS**, 2003. 198 p.

23. JACQUES, A.V.A. Potencialidades das pastagens do Rio Grande do Sul visando à intensificação da pecuária. **Produção de bovinos de corte. Porto Alegre: EDIPUCRS**, 1999. p.67-76.
24. KAPP, O.; MOLETTA, J.L.; STRACK, A.G.; BREN, L. Influência do uso do sal mineral proteinado sobre a produção de carne em pastagem de *Hemarthria altissima* cv. Flórida. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Piracicaba, 2001. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.1249-1250.
25. GRUMMER, R. R., CARROLL, D. J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3838-3852, 1991.
26. NOLAN , C.J.; NEUENDORFF , D.A.; GODFREY, R.W.; HARMS , P.G.; WELSH , T.H., JR.; MCARTHUR, N.H.; RANDEL , R.D. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of brahman bulls. **Journal Animal Science**, v. 68, p.1987-1996, 1990.
27. TALAVERA, F.; PARK, C.S.; WILLIAMS, G.L. Relationship among dietary lipid intake, serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. **Journal Animal Science**, v. 60 (4), p.1045-1051, 1985.
28. SIROTKIN, A.V. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. **The Veterinary Journal**, v.2, p.949- 992, 2004.
29. SPITZER, J. C.; MORRISON, D. G.; WETTEMANN, R. P.; FAULKNELS, L. C. Reproductive Responses and Calf Birth and Weaning Weights as Affected by Body Condition at Parturition and Postpartum Weight Gain in Primiparous Beef Cows. **Journal Animal Science**, v.73, p.1251-1257, 1995.
30. PATTON, R.A.; BUCHOLTZ, H.F.; SCHMIDT, M.K. Body condition scoring: a management tool. **Dairy Guide, East Lansing: Michigan**, 1988. p.6.
31. RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C.; WARNER, M. B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.62, p.300-306, 1986.
32. SELK, G. E.; WETTEMANN, R. P.; LUSBY, K. S.; OLTJEN, J. W.; MOBLEY, S.L.; RASBY, R.J., GARMENDIA, J. C. Relationships among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. **Journal Animal Science**, v.66, p.3153-3159, 1988.
33. ANDERSON, S.J.; KLOPFENSTEIN, T.J.; WILKERSON, V.A. Escape protein supplementation of yearling steers grazing smooth brome grass pastures. **Journal of Animal Science**, v.66, p.237-242, 1988.