

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

**HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO SÉRICO COMO PREDITOR DA
PUBERDADE DE TOUROS JOVENS NELORE**

VANESSA LOPES DIAS QUEIROZ

CAMPO GRANDE, MS

2014

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

**HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO SÉRICO COMO PREDITOR DA
PUBERDADE DE TOUROS JOVENS NELORE**

Serum anti-Müllerian hormone as a predictor of puberty in Nellore young bulls

Vanessa Lopes Dias Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva

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

CAMPO GRANDE, MS

2014

*Aos meus pais, José Ramos e Leni, pela
educação, amor e apoio incondicional.*

*Ao Nero, pelo amor e companheirismo
mesmo a distância, sempre.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família

Aos meus pais, José Ramos e Leni, por me ensinarem os verdadeiros valores da vida, pelo apoio em minhas decisões, por todo amor, carinho, conselhos, ensinamentos, por sempre me fazerem sentir a filha mais especial do mundo, enfim, jamais conseguiria exprimir meu agradecimento em palavras a quem devo tudo o que sou...

Ao meu namorado

Ao Nero, por todo amor, carinho, amizade, companheirismo, apoio, compreensão, mesmo tão distante se fez presente, sempre. Amo te.

Aos meus amigos

A minha irmã de coração, Nathy, pela nossa linda amizade, companheirismo, carinho, por longas e longas horas de internet me fazendo companhia... “Algumas amizades passam rápido, num piscar de olhos. Outras são feitas para durar até que você pisque pela última vez”, minha pititinha.

Ao Rafinha, meu brother, pela nossa forte amizade ao longo destes sete anos, pelo carinho para comigo, companheirismo, por sua alegria contagiante.

À minha orientadora, por todo ensinamento, incentivo, disposição e compreensão me apoiando em todas as vezes que viajei para casa. Por acreditar em meu potencial e me receber tão bem. Muito Obrigada!

À professora querida, Maria Inês, por todo aprendizado, amizade e carinho que levarei para sempre.

À professora Fana, pelo carinho, amizade e colaboração nos meus textos.

Ao Luiz, pela amizade, carinho e apoio ao longo destes dois anos.

À equipe do Laboratório de Reprodução Animal: Gabriela, Vitor, Cynthia, Vinícius, Ellen, Larissa, Alini, pela amizade e auxílio.

Aos técnicos do laboratório, Sr. Ludomir, pelos ensinamentos na morfologia espermática e conselhos e o Sr. Luiz por arrumar todo o material para as saídas de campo, perfeitamente, por manter o laboratório sempre organizado, pelo cafezinho gostoso de todos os dias e longas conversas.

Ao Gustavo Macedo pelo auxílio quando cheguei a Campo Grande.

Aos meus amigos de Mestrado e em especial: Breno, Lorena, Érika, Ronaldo, Eudiley, Marcelo e Gustavo, pela amizade e carinho.

À D. Cida e Sr. Everaldo, por terem me acolhido e se tornado uma nova família em Campo Grande.

À Camila, minha companheira de República, pela amizade e carinho!

À UFMS pela oportunidade e ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

Muito obrigada, contem sempre comigo!

*“A sorte favorece os destemidos.”
(Alexandre, O Grande).*

*[...] Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.
O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor
que pode dar a forma. Tudo depende só de mim.
(Charles Chaplin)*

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original"
(Albert Einstein)*

Resumo

QUEIROZ, V.L.D. Hormônio anti-mülleriano sérico como preditor da puberdade de touros jovens Nelore. 2014. 62p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Este estudo foi realizado para verificar a correlação entre a concentração sanguínea de hormônio anti-Mülleriano (HAM) e testosterona (T) com a precocidade sexual de machos bovinos zebuínos, determinar a relação do HAM com a puberdade e avaliar a eficiência do estudo ultrassonográfico dos testículos para a definição da idade à puberdade. *Bos indicus* (Nelore, n = 37), com 10 a 16 meses de idade, foram submetidos a pesagens, biometria testicular, coletas de sangue e sêmen e exames de ultrassonografia testicular, em coletas trimestrais de dados (julho, outubro e janeiro). Os animais foram classificados em púberes e não púberes. A partir dos animais púberes, definiu-se a classe de precocidade sexual em touros superprecoces incluindo aqueles que atingiram a puberdade até 13 meses de idade (n = 5); precoces, aqueles que atingiram a puberdade entre 14 e 16 meses (n = 21) e tardios como aqueles que alcançaram a puberdade após 16 meses (n = 11). A classe de precocidade sexual foi positivamente correlacionada com a variação observada nas concentrações séricas de HAM (r = 0,5145; P = 0,0001) o que não ocorreu entre a classe de precocidade e T (r = -0,1483, P > 0,05). Os animais superprecoces apresentaram uma menor média na concentração circulante de HAM (6,13 ± 0,64), ao decorrer das coletas, diferentemente dos animais precoces (12,14 ± 2,63) e tardios (47,64 ± 5,74). Na distinção da classe de puberdade, o perímetro escrotal se mostrou mais eficiente em diferenciar os animais púberes dos não púberes (r = 0,7770; P = 0,0001) quando comparado ao HAM (r = -0,3500; P = 0,0002). Os animais não púberes apresentaram uma menor média de ecogenicidade testicular (113,47 ± 3,69) quando comparado aos púberes (150,95 ± 2,58). Conclui-se que o HAM pode ser um marcador endócrino efetivo na distinção dos animais superprecoces dos animais tardios com uma única coleta sanguínea, na desmama e concentração, aproximadamente, de cinco ng/mL. A avaliação ultrassonográfica dos testículos se mostrou eficiente na distinção dos animais púberes dos não púberes, porém não se correlacionou com a precocidade sexual.

Palavras-chave: endocrinologia, precocidade sexual, testosterona, touros, ultrassonografia testicular.

Abstract

QUEIROZ, V.L.D. Serum anti-Müllerian hormone as a predictor of puberty in Nelore young bulls. 2014. 62p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

This study was conducted to examine the correlation among serum anti-Müllerian (AMH) and testosterone (T) hormones concentration with sexual precocity of Nelore young bulls; also, determine the relationship of AMH with puberty and evaluate the efficiency of testis ultrasonography defining the age at puberty. *Bos indicus* (Nelore, n = 37), 10 to 16 months of age, underwent weighing, scrotal circumference, blood samples and semen collected and ultrasonography of the testis, quarterly data collection (July, October and January). The animals were classified as pubertal and not pubertal. From the pubertal animals, they were classified according to the class of sexual precocity in super maturing animals which included those who reached puberty before 13 months of age (n = 5); maturing bulls, those who reached puberty between 14 and 16 months (n = 21) and late bulls as those who reached puberty after 16 months (n = 11). Class of sexual maturity was positively correlated with variation in serum AMH (r = 0.5145, P = 0.0001) which did not occur between the class of precocity and T (r = -0.1483, P > 0.05). The super maturing animals showed a lower mean in the circulating concentration of AMH (6.13 ± 0.64) in all collections, unlike the animals maturing (12.14 ± 2.63) and late bulls (47.64 ± 5.74). Distinction in the class of puberty, scrotal circumference was more efficient in differentiating non-pubescent of pubescent animals (r = 0,7770; P = 0,0001) when compared to the HAM (r = -0,3500; P = 0,0002). Non-pubertal animals had a lower mean testicular echogenicity (113.47 ± 3.69) compared to pubescent (150.95 ± 2.58). In conclusion, the AMH may be an effective endocrine marker in distinguishing from late bulls of super maturing bulls with a single blood collection, at weaning and concentration approximately five ng/mL. Moreover, the ultrasonography evaluation of the testis proved effective in distinguishing pubertal animals of not pubescent, but not correlated with sexual precocity.

Keywords: bulls, endocrinology, reproductive precocity, testicular ultrasonography, testosterone

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Médias (\pm erro padrão), dos três momentos de coleta – julho, outubro e janeiro, da concentração sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) e testosterona (T), perímetro escrotal (PE), volume testicular, ecotextura testicular (ECO_t), motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, defeitos maiores, menores e totais de machos Nelore (n= 37) de acordo com a classe de puberdade..... 43
- Tabela 2. Médias (\pm erro padrão), dos três momentos de coleta – julho, outubro e janeiro, da concentração sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) e testosterona (T), perímetro escrotal (PE), volume testicular, ecotextura testicular, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, defeitos maiores, menores e totais de machos Nelore (n = 37) de acordo com a classe de precocidade sexual.....44
- Tabela 3. Correlação de Pearson, nos três momentos de coleta - julho, outubro e janeiro, machos Nelore (n=37), entre as variáveis idade, classe de precocidade (cIPREC), hormônio anti-mülleriano (HAM), testosterona (T), peso corporal (PESOC), perímetro escrotal (PE), ecotextura testicular (ECO_t), ordem de coleta (ORDCOL) e volume testicular (VOLTEST).....45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Concentração sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) expresso em ng/mL em bezerros Nelore classificados de acordo com a precocidade sexual em função do tempo. Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho (1), outubro (2) e janeiro (3), entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.....	55
Figura 2.	Concentração sérica de testosterona, expressa em ng/mL, em bezerros Nelore classificados de acordo com a precocidade sexual em função do tempo. Coletas sanguíneas realizadas nos meses julho (1), outubro (2) e janeiro (3), entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.....	56
Figura 3.	Probabilidade estimada de puberdade, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL. Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 40 e 64 semanas de idade de machos bovinos Nelore.....	57
Figura 4.	Probabilidade estimada de puberdade de acordo com o perímetro escrotal (PE), em centímetros. Coletas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 40 e 64 semanas de idade de machos bovinos Nelore.....	58
Figura 5.	Probabilidade estimada de precocidade sexual, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL em análise de regressão logística pareada com os animais superprecoces (SP) e precoces (P). Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 40 e 64 semanas de idade de machos bovinos Nelore.	59
Figura 6.	Probabilidade estimada de precocidade sexual, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL em análise de regressão logística pareada com os animais superprecoces (SP) e tardios (Td). Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 40 e 64 semanas de idade de machos bovinos.....	60
Figura 7.	Probabilidade estimada de precocidade sexual, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL em análise de regressão logística pareada com os animais precoces (P) e tardios (Td).). Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 40 e 64 semanas de idade de machos bovinos Nelore.	61
Figura 8.	Intensidade de pixel (Pixel) em bezerros Nelore classificados de acordo com a precocidade sexual em função do tempo. Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho (1), outubro (2) e janeiro (3), entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Puberdade.....	13
2.2 Biometria testicular.....	14
2.3 Avaliação andrológica.....	16
2.4 Ultrassonografia testicular.....	17
2.5 Hormônio anti-Mülleriano.....	21
2.6 Hormônio anti-Mülleriano e Testosterona.....	24
3. REFERÊNCIAS.....	26
4. OBJETIVOS.....	34
Hormônio anti-Mülleriano sérico como preditor da puberdade de touros Nelore jovens.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Materiais e Métodos.....	39
Resultados.....	43
Discussão.....	46
Conclusões.....	49
Agradecimentos.....	50
Referências.....	50

1. INTRODUÇÃO

A antecipação da puberdade pode ter uma representação relevante na taxa de desfrute de um rebanho ao proporcionar a diminuição da idade de entrada dos animais em reprodução. Além disso, a seleção precoce de touros proporciona a aceleração do melhoramento genético do rebanho principalmente via a diminuição do intervalo entre gerações. Isso conseqüentemente resulta em aumento da lucratividade dos diferentes sistemas de produção animal (Barth & Ominski, 2000).

Em função do crescente interesse no gado zebu devido à sua melhor adaptação ao ambiente tropical, a acurácia na determinação da puberdade em machos é de extrema importância no sentido de identificar animais mais precoces sexualmente. Esta característica possui média herdabilidade, o que faz com que seja o foco principal de utilização nos programas de melhoramento genético (Siddiqui et al., 2008).

Recentemente, a ciência tem avançado significativamente no uso de diferentes ferramentas para melhorar a seleção para precocidade sexual, tais como ultrassonografia testicular, métodos de avaliação da integridade e eficiência biológica da célula espermática e identificação de marcadores biológicos para eficiência reprodutiva (Abdel-Razek & Ali, 2005). A ultrassonografia pode ser usada como uma técnica complementar ao exame clínico em rebanhos, auxiliando no diagnóstico de problemas de infertilidade e possibilitando decisões rápidas e tratamentos apropriados. Este recurso traz uma nova dimensão para a reprodução animal em todos seus aspectos anatomofisiopatológicos (Moura & Merkt, 1996).

Um método promissor é a quantificação do hormônio anti-Mülleriano (HAM), que poderá atuar como um biomarcador para uma possível detecção da puberdade precoce em touros. Ele é secretado pelas células de Sertoli e, estas, estão entre as primeiras células a se diferenciarem nas gônadas fetais do macho, e promovem a secreção deste hormônio responsável pela regressão dos ductos de Müller (Behringer et al., 1994; Mishina et al., 1996; Rey et al., 2003). Em seres humanos, o HAM já é utilizado como parâmetro clínico auxiliar no diagnóstico de puberdade precoce e tardia, identificadas nessa espécie como uma patologia do desenvolvimento sexual (Rey et al., 1993).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Puberdade

O início da puberdade dá-se com o aparecimento da fertilidade em seus aspectos funcionais, fisiológicos e comportamentais. Porém, estes eventos não ocorrem concomitantemente e, por isso, existem combinações de diferentes parâmetros a fim de caracterizar seu início (Freneau, 1996).

Define-se o macho bovino púbere como aquele que apresenta em seu ejaculado: motilidade progressiva $\geq 10\%$ e no mínimo 50 milhões de espermatozoides totais. A puberdade ocorre quatro semanas após o surgimento das primeiras células espermáticas no ejaculado e duas semanas após o aparecimento dos primeiros espermatozoides móveis no sêmen (Wolf et al., 1965; Killian & Amann, 1972). Já Lunstra & Echternkamp (1982) observaram um período de oito semanas e meia entre o surgimento dos primeiros espermatozoides e a puberdade.

Por outro lado, o aparecimento dos primeiros espermatozoides móveis no ejaculado, também é apontado como fator indicador para o início da puberdade. Este evento está diretamente relacionado a fatores genéticos, condições nutricionais pré e pós desmama, manejo e até linhagem dentro da raça (Garcia et al., 1987).

Touros zebuínos apresentam um desenvolvimento testicular mais lento e tendem a atingir a puberdade mais tardiamente quando comparados aos taurinos. O estresse térmico e a qualidade dos alimentos oferecidos podem influenciar nesta fase fisiológica (Perotto et al. 2001; Nogueira, 2004). Machos Nelore que receberam alimentação suplementar foram mais pesados, apresentaram maior perímetro escrotal (PE) e concentrações séricas superiores de testosterona quando comparados aos animais não suplementados. Desta forma, há uma inter-relação entre as características reprodutivas e a alimentação (Costa, 1999).

Em raças europeias de corte, o PE pode prever precisamente o início da puberdade, independentemente da idade, raça ou peso corporal. Há uma correlação de 0,65 entre idade à puberdade e PE (Lunstra et al., 1978; Lunstra & Echternkamp, 1982).

Considerando *Bos indicus*, um estudo utilizando 207 machos Guzerá sexualmente inexperientes, 69% destes tornaram-se púberes entre 16 e 18,9 meses de idade, apresentando PE compreendido entre 23,0 e 25,5 cm (Torres Júnior & Henry, 2005). Em um experimento com 619 machos dessa mesma raça, 71,3% da população já havia atingido a puberdade aos 18 meses de idade (Carmo et al., 2007). Outro experimento com 330 machos Guzerá, a idade

média à puberdade foi 19,6 meses com 22,8 cm de PE, sendo a proporção de machos púberes na faixa etária de 12-16 meses de 7,4%; dos 16-20 meses de 41,23%; dos 20-24 meses de 68% e dos 24-28 meses de 91,96% (Osório et al., 2012).

Com o intuito de estudar o desenvolvimento do epitélio seminífero de touros da raça Brahman, Aponte et al. (2005) orquiectomizaram 23 animais pré-púberes e avaliaram histologicamente o epitélio seminífero. Estes pesquisadores afirmaram que as células de Sertoli imaturas diminuíram gradualmente em número e já não eram detectadas após, aproximadamente, 14 meses de idade, ao mesmo tempo em que o número destas células maduras aumentou de 10 a 14 vezes; a espermatogênese iniciou-se durante o nono mês. A conclusão destes autores foi de que o início tardio da puberdade em touros Brahman, deve-se a maior duração do período pré-púbere, decorrente de um atraso no início da espermatogênese.

Averiguando o desenvolvimento sexual e a função reprodutiva de 22 touros Angus x Charolês e 17 touros Angus entre 6-16 meses de idade, Brito et al. (2012a) relataram que a qualidade do sêmen melhorou gradualmente com a idade, e o intervalo entre a puberdade e maturidade sexual foi de, aproximadamente, 50 dias.

2.2 Biometria testicular

O perímetro escrotal (PE) é considerado um dos parâmetros mais utilizados para a seleção de reprodutores, devido a sua facilidade de mensuração (Lunstra et al., 1978). Ele tem sido o critério mais usado em programas de seleção, como medida indicativa de características morfométricas e fisiológicas das gônadas (Brinks, 1987; Silva et al., 2002). Além de ser facilmente avaliado, apresenta alta repetibilidade e herdabilidade de moderada a alta e é correlacionado com ganho de peso, produção espermática e qualidade seminal. Além de apresentar correlações genéticas com características reprodutivas das fêmeas, podendo aumentar o peso corporal ao ano e ao sobreano dos animais selecionados para diminuir idade ao primeiro parto, através da resposta correlacionada (Hahn et al., 1969; Coulter et al., 1975; Coulter & Foote, 1979; Kastelic et al., 2001; Dias et al., 2003; Yokoo et al., 2012).

Há correlações genéticas negativas ou não significativas entre PE e peso corporal e as mudanças no peso corporal, como resultado de seleção, não resultam necessariamente em ganhos proporcionais no PE (Makarechian et al., 1984). A taxa de crescimento testicular torna-se muito mais lenta que a do peso corporal após 12 meses de idade (Barber & Almquist, 1975; Makarechian et al., 1985).

Os testículos crescem em uma fase inicial lenta e, posteriormente, apresentam um pico que coincide com a puberdade; mais adiante há novamente um crescimento lento, indicativo da maturidade sexual, caracterizando uma curva sigmoide (Quirino et al., 1999a). Loaiza-Echeverri et al. (2013) observaram que o desenvolvimento do PE em touros Guzerá foi caracterizado por uma fase de crescimento acelerado, entre os meses 10,6 e 14,5, seguido por um declínio na taxa de crescimento e, afirmaram que estes resultados foram significativamente influenciados pelos efeitos ambientais, sendo recomendadas comparações com outras raças.

Experimentos conduzidos por Vale Filho et al. (2001) e Moura et al. (2002), com touros da raça Tabapuã e Nelore, respectivamente, ambos apresentaram um aumento do PE progressivamente com o avançar da idade. As características relacionadas à biometria testicular de Nelore, criados extensivamente na região Centro Oeste do Brasil, aumentaram com o ganho de peso nos animais de 17 a 36 meses de idade (Viu et al., 2006). A causa do maior peso testicular é uma quantidade mais elevada de parênquima, com uma área superior de túbulos seminíferos para produzir espermatozoides. Diferentes métodos de pesquisa têm demonstrado que há uma relação positiva entre a produção de espermatozoides, tamanho dos testículos e PE (Freneau, 1991). Um maior PE está associado com precocidade sexual, mais esperma, maior porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e melhor performance reprodutiva em fêmeas (Kastelic, 2014).

É conhecido, que esse parâmetro apresenta estreitas relações, não só nos machos como também nas fêmeas do rebanho, como a idade à primeira cobertura e idade ao primeiro parto (Toelle & Robinson, 1985; Siqueira et al., 2013). Medidas testiculares podem ser utilizadas como critério de seleção de reprodutores, auxiliando no processo de melhoria da eficiência reprodutiva dos rebanhos, uma vez que filhas dos touros que apresentam maior PE são mais precoces e apresentam melhores índices reprodutivos (Martin et al., 1992; Kastelic & Thundathil, 2008). Meio-irmãs apresentam alta correlação entre o PE e a idade à puberdade, com uma herdabilidade de 0,34 para o PE em Nelore, apresentando correlação genética da característica com idade à puberdade das filhas (Brinks, 1987; Martins Filho & Lôbo, 1991).

Em contrapartida, o PE é uma medida indireta da massa testicular que não considera a variação individual na forma dos testículos, sugerindo que o comprimento e a largura testiculares atuam como ferramentas úteis para o cálculo de volume e peso testicular. Além disso, o PE é dependente da idade, condição corporal e raça, podendo esses parâmetros influenciar a qualidade seminal. O PE isoladamente, não é um bom parâmetro para escolher um reprodutor, tornando-se necessário a inclusão de outras mensurações, como o volume

testicular, por exemplo (Bailey et al., 1998).

Os testículos longos prejudicam o potencial reprodutivo do macho. Ejaculados provenientes destes testículos, apresentam maior concentração de espermatozoides/mL do que ejaculados de testículos ovoides, embora estes últimos apresentem PE maiores. A maior concentração de espermatozoides/mL deve-se a termorregulação mais eficiente, oriunda da melhor distribuição de vasos sanguíneos e túbulos seminíferos, importantes na produção espermática (Bailey et al., 1996; 1998).

Todavia, correlações genéticas positivas e de alta magnitude entre o volume testicular e o PE de 0,99, indicam que este critério é apropriado para ser utilizado nos programas de melhoramento genético, em touros Nelore. Ademais, o PE e o volume testicular são influenciados, na sua maioria, pela ação dos mesmos genes aditivos. Destarte, o PE tem sido utilizado como critério de seleção em programas de melhoramento, visando maior crescimento corporal e fertilidade (Dias et al., 2008; Siqueira et al., 2013).

2.3 Avaliação andrológica

A saúde reprodutiva dos touros envolvendo a normalidade dos órgãos genitais, libido, habilidade sexual, além de seu desempenho quantitativo e qualitativo de produzir espermatozoides aptos à fecundação é fulcral na seleção de touros a serem utilizados como reprodutores (Fonseca et al., 2000). Desta forma, a avaliação da fertilidade do touro depende não só do exame clínico e da biometria testicular, mas, também, da avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen (Salvador et al., 2003).

O descarte de touros de corte, devido às alterações na qualidade seminal é uma importante fonte de prejuízo nos sistemas de produção de bovinos de corte, uma vez que o conhecimento da baixa fertilidade ou esterilidade poderá comprometer por longo prazo a produção, se não diagnosticado em tempo hábil. Assim, o exame andrológico tem como objetivos a seleção e comercialização de reprodutores, diagnóstico de sub ou infertilidade, diagnóstico de ocorrência de puberdade, avaliação do potencial reprodutivo pré-estação de monta etc. (Chacón et al., 1999; Franco et al., 2006; Horn et al., 2003).

A motilidade espermática progressiva e a porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos constituem análises de rotina na verificação da qualidade seminal (Rodríguez-Martínez, 2005), uma vez que as anormalidades espermáticas atuam como um agravante na fertilidade, pois a maioria é de natureza genética (Unanian, 1999). Essas anormalidades

espermáticas possuem alta correlação com a taxa de fertilidade e alcançam 30% de herdabilidade (Quirino et al 1999b; Sarreiro et al. 2002).

As alterações espermáticas podem ser classificadas em: os defeitos maiores, que em altas porcentagens podem estar relacionados às alterações durante a espermatogênese, e defeitos menores que, em geral, não afetam a fertilidade, desde que em baixos valores percentuais (Blom 1973). Sugere-se que a porcentagem de defeitos maiores não exceda 20 % e que cada patologia espermática individual 5%, a fim de não comprometer a eficiência reprodutiva (Henry & Neves, 1998). A maturidade sexual é atingida quando os touros apresentam ejaculado $\geq 50\%$ de motilidade espermática progressiva e morfologia espermática $\leq 10\%$ de defeitos maiores e 20% de defeitos menores (Blom, 1973).

2.4 Ultrassonografia testicular

Ondas acústicas de alta frequência são emitidas pelo transdutor do aparelho de ultrassom a fim de produzir imagens de órgãos e tecidos. A produção destas ondas dá-se pela vibração de cristais com propriedades piezoelétricas que estão localizados no transdutor do aparelho (Griffin & Ginther, 1992; Goddard, 1995). A partir do conhecimento dos fenômenos piezoelétricos, a ultrassonografia foi utilizada, pela primeira vez, durante a década de 1940, com propósito militar através do sonar (*Sound Navigator and Ranging*), e os primeiros relatos de uso na Medicina Veterinária foram feitos há aproximadamente 30 anos, entretanto, a significativa difusão e popularização se deram na década de 1980 (Viana et al., 2004).

A impedância acústica, ou seja, a capacidade dos tecidos em refletir as ondas de alta frequência, revela o potencial ultrassonográfico de cada tecido. De acordo com a proporção de ondas que é refletida no transdutor do aparelho, chamados de ecos, formam-se uma corrente elétrica que será amplificada e transformada, no visor do ultrassom, em pontos de diferentes tonalidades de cor cinza, com variações incluindo o preto e o branco. Isto ocorre devido à heterogeneidade ecogênica dos tecidos. A junção destes ecos forma uma imagem bidimensional, observada no visor do aparelho (Griffin & Ginther, 1992; Ribadu & Nakao, 1999). Estes aparelhos possuem transdutores de diversas frequências, sendo as mais utilizadas na área da reprodução as de 3,5; 5,0 e 7,5 MHz. Para obter-se uma maior resolução da imagem, faz-se uso da maior frequência do transdutor, o que significa que a capacidade de penetração das ondas acústicas é mais superficial (Ribadu & Nakao, 1999).

Nos órgãos reprodutivos, a velocidade com que se propaga a onda sonora por meio dos diferentes tecidos é de 1.495 m/segundo (fluidos) e 4.080 m/segundo (ossos), dependendo da

densidade e da compressibilidade do meio (Herring & Bjornthon, 1985). A imagem ultrassonográfica ótima dos testículos, que é um órgão superficial, é obtida usando-se uma frequência de 5,0 ou 7,5 MHz, pois baixas frequências não fornecem alta qualidade de resolução (Pugh et al., 1990).

A maior parte dos aparelhos de ultrassom é do tipo modo B “modo brilho” ou “modo bidimensional”, ou seja, quanto maior a reflexão da onda, mais intenso será o brilho do ponto luminoso (Carvalho, 2004). Neste tipo de ultrassom a imagem é formada por pixels, que correspondem a menor unidade formadora de imagem e, cada um destes é caracterizado por um tom de cinza que compreende uma escala de 256 tons, sendo o zero correspondente à cor preta e o 255 à cor branca. A imagem de ultrassonografia é formada por uma combinação de milhares de pixels (Griffin & Ginther, 1992; Goddard, 1995; Ribadu & Nakao, 1999).

As estruturas podem ser classificadas de quatro maneiras: 1) Anecoicas são aquelas visualizadas em preto no aparelho de ultrassom, uma vez que elas não refletem onda sonora, pois não produzem ecos, como, por exemplo, a bexiga urinária, folículos ovarianos e cistos 2) Hiperecoicas são resultantes de órgãos que refletem praticamente todas as ondas que incidem sobre eles, sendo mais brilhantes, e aparecem no monitor na cor branca, como exemplos: tecido ósseo, cálculos, calcificação e tecido fibroso 3) Hipoecoicas são resultante de imagens originadas de tecidos que refletem ecos em menor intensidade, produzindo pontos menos brilhantes, como, por exemplo, tecidos parenquimatosos 4) Isoecoicas são aquelas estruturas que apresentam a mesma intensidade de brilho (Sánchez & Alfonso, 2000).

O recurso ultrassonográfico pode ser usado como uma técnica complementar ao exame clínico em rebanhos, auxiliando no diagnóstico de problemas de infertilidade, possibilitando decisões rápidas e tratamentos apropriados. Isto traz uma nova dimensão para a reprodução animal, em todos seus aspectos anatomofisiopatológicos (Moura & Merkt, 1996). Trata-se de um método não invasivo que pode ser utilizado para determinar as medidas dos testículos de forma direta (Cartee et al., 1986; 1989), além de ser preferível sob uma perspectiva de bem-estar animal (Hildebrandt et al., 2000).

A imagem computadorizada permite uma avaliação do parênquima testicular, possibilitando o acompanhamento de todo o seu desenvolvimento. As túnicas do testículo são visualizadas na imagem computadorizada, porém, não são distinguíveis entre si, a não ser que haja presença de fluido entre elas. Uma linha ecogênica brilhante, que separa o escroto do parênquima, é observada. A presença de até dois milímetros de fluido entre as túnicas é um achado normal. Outra estrutura testicular facilmente detectável é o mediastino. Ele corresponde a uma organização linear de cinco milímetros de largura, hiperecoico quando

visto no plano longitudinal. Já sob o ponto de vista transversal, ele é observado sob a forma de um ponto ecogênico no centro do parênquima testicular (Pechman & Eilts, 1987). Estes autores concluíram em estudo com animais *Bos taurus*, que a espessura do mediastino e sua ecogenicidade diminuem com a idade.

Todavia, esse fato foi contraditório em Nelore, em que a espessura média do mediastino testicular aumentou em proporção direta à idade dos animais, embora tenha sido observada uma diferença significativa ($P < 0,05$) somente no intervalo dos nove aos 13 meses (Cardilli et al., 2010). Estes achados assemelham-se às afirmativas de Abdel-Razek & Ali (2005).

A ultrassonografia pode vir a ser utilizada para descartar touros adultos com alterações no parênquima testicular, desde que seja acompanhada ao longo do tempo, a fim de garantir maior confiabilidade no diagnóstico e no prognóstico, oferecendo, desta maneira, maior segurança ao uso do recurso ultrassonográfico na clínica andrológica (Costa e Silva et al. 2013).

Áreas de fibrose testicular são comumente visíveis no monitor do ultrassom, particularmente em touros de corte jovens, como irregulares e intensamente brancas. Estas áreas podem ser observadas como múltiplos pequenos focos “polvilhados” em todo o parênquima, únicos ou diversos focos maiores limitados às áreas específicas ou, ainda, pequenos focos múltiplos na região dos túbulos retos ao redor do mediastino. Lesões com um padrão radial, que são aparentemente associadas à fibrose de túbulos seminíferos individuais inteiros, desde a origem até a inserção com a rede testicular, também são possíveis de serem observadas utilizando esse recurso (Kastelic & Brito, 2012).

Neste sentido, com o objetivo de averiguar o comprometimento causado por lesões fibróticas observadas através da imagem ultrassonográfica testicular sobre a qualidade seminal, utilizando 402 touros da raça Nelore, Pinho et al. (2013) afirmaram que não houve correlação entre as características seminais e os valores de pixels das imagens computadorizadas. Logo, de acordo com estes autores, a avaliação da imagem ultrassonográfica testicular não se constituiu em uma ferramenta útil para avaliar lesões fibróticas em touros Nelore adultos.

Machos Nelore, $n=21$, idade média de 246 dias, foram submetidos à orquiectomia a fim de investigar histologicamente o aparecimento de múltiplos pontos hiperecoicos, observados através do ultrassom. O tamanho das possíveis fibroses encontradas não foi suficiente para produzir um ponto hiperecoico visível na imagem computadorizada. Assim, esses achados ultrassonográficos não devem ser utilizados como recurso clínico de prognóstico único para definição de quadros de infertilidade em animais Nelore nesta idade (Queiroz et al., 2013).

É sabido que o parênquima testicular de bovinos adultos é moderadamente ecogênico e homogêneo (Pechman & Eilts, 1987; Abdel-Razek & Ali, 2005) enquanto nos animais pré-púberes da raça Nelore apresenta-se com baixa ecogenicidade e heterogêneo (Sakamoto et al., 2006; Pastore, 2008, Cardilli et al., 2009). Esta diferença de ecogenicidade, observada nos testículos em distintas fases de maturação, é de suma importância clínica, visto que desarranjos testiculares como processos inflamatórios ou tumores, podem ser visualizados na imagem ultrassonográfica como pontos hiperecoicos na ecogenicidade moderada dos testículos dos animais adultos e dificilmente observada em animais jovens devido à baixa ecogenicidade (Arger et al., 1981; Bird & Rosenfield, 1984; Eilts et al., 1988, Simon et al., 2001; Cardilli et al.; 2009).

Em bovinos de origem taurina, com idade compreendida entre a segunda e a quadragésima sexta semana, utilizando a ultrassonografia testicular a cada duas semanas, houve uma elevação da ecogenicidade com o avançar da idade, refletindo inicialmente uma proliferação celular - divisão das espermatogônias e formação de células maduras da espermatogênese - seguida de um aumento da densidade das células que darão origem ao espermatozoide. Desta forma, foi possível identificar através da ecogenicidade, o momento em que os animais atingiram a puberdade (Chandolia et al., 1997).

Aravindakshan et al. (2000) estudando a ecogenicidade testicular de 20 touros mestiços da segunda à quadragésima quinta semana de idade, observaram que, do nascimento até 16 semanas, houve aumento da ecogenicidade atribuído à proliferação celular. Entre a 16^o e 24^o semana os touros apresentaram queda na ecogenicidade atribuído ao aumento de volume fisiológico dos túbulos seminíferos nesta fase, posteriormente às 24 semanas a ecogenicidade novamente mostrou-se elevada, explicada pela divisão das espermatogônias e maior quantidade de células maduras na espermatogênese. Esses pesquisadores ressaltam, ainda, que sete dos 20 touros estudados tornaram-se púberes mais precocemente que os outros e, estes animais demonstraram, através da ultrassonografia, significativamente, uma maior ecogenicidade testicular em relação aos tardios, reforçando a importância dessa técnica na identificação da precocidade sexual.

Um estudo com Nelores púberes e não púberes, com idade média de 15 meses, demonstrou diferença na ecogenicidade testicular, já que touros do primeiro grupo apresentaram maior ecogenicidade que os não púberes, sugerindo que esta técnica pode vir a ser usada como indicador de precocidade sexual (Pastore, 2008).

Em um estudo conduzido por Brito et al. (2012b) a fim de avaliar a intensidade do pixel na ecografia testicular durante o desenvolvimento sexual, os autores utilizaram touros de corte

(n=152) com idades de 14-26 semanas a até 70-74 semanas, durante quatro anos de experimento, e destacaram que o aumento mais acentuado da ecogenicidade testicular ocorreu entre 20 e 46 semanas de idade, embora em alguns grupos de touros, a intensidade de pixels revelou-se superior em idades mais jovens, e os valores máximos foram atingidos às 34 semanas. Conforme estes pesquisadores, a ecogenicidade começou a elevar-se a partir das 12-16 semanas anteriores à chegada da puberdade, e apresentou valores máximos nas quatro semanas precedentes a ela. Destarte, estes achados revelam que uma determinada fase do desenvolvimento do parênquima testicular deve ser atingida antes mesmo do início da puberdade e, a composição parenquimal permaneceu consistente após o animal ter-se tornado púbere. Essas modificações na ecogenicidade testicular ocorreram concomitantemente com as alterações visualizadas na histologia dos animais pré-púberes, sugerindo que, possivelmente, elas estejam relacionadas à diferenciação das células de Sertoli, ao aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos, à formação da barreira hemato-testicular.

Em um estudo conduzido por Cardilli et al. (2012), com touros Nelore, exames ecográficos dos testículos de 19 bovinos foram realizados aos 10, 12, 14, 16 e 18 meses de idade. Eles concluíram que a ecogenicidade do parênquima testicular apresenta alta correlação positiva com o volume testicular e o perímetro escrotal.

Destarte, a imagem ultrassonográfica testicular pode ser utilizada como método auxiliar no exame andrológico, além de ser útil no diagnóstico de patologias. Além disso, quando associada ao exame clínico andrológico, poderá atuar como uma ferramenta a ser usada na seleção de precocidade sexual.

2.5 Hormônio anti-Mülleriano

O hormônio anti-Mülleriano (HAM), também conhecido como substância inibidora dos ductos de Müller, é formado por uma proteína precursora homodimérica, ligada por duas pontes de dissulfeto, com massa molecular de 140 kDa. Após clivagem proteolítica, é produzido um fragmento inativo de 110 kDa e outro, biologicamente ativo, de 25 kDa na região C-terminal (Giuli et al., 1997). Esta glicoproteína é produzida a partir do momento em que ocorre a diferenciação dos túbulos seminíferos no testículo fetal, até a maturação puberal em seres humanos (Josso et al., 1990). Segundo recente relato de Campbell et al. (2012), nos ovinos, o HAM predomina no fluido folicular com massa molecular 140 KDa.

Esse hormônio pertence à superfamília do TGF- β (fator transformador de crescimento) e se expressa nas células de Sertoli fetais, pré-puberis e púberes (Lane & Donahoe, 1998).

Sua ação é mediada por duas classes de receptores de membrana, serina/treonina/kinases tipo I e II. Os receptores do tipo I possuem mecanismos de ação que ainda permanecem desconhecidos e são compartilhados com outros membros da superfamília. Já os receptores do tipo II, contrariamente à maioria dos membros da família TGF- β , os quais possuem diversos órgãos-alvo e múltiplas funções, são expressos apenas nos órgãos-alvo do HAM – órgãos reprodutivos, como por exemplo, nas células mesenquimais que circundam os ductos de Müller durante o período de regressão e nas gônadas de ambos os sexos (Baarends et al., 1994; Di Clemente et al., 1994; Rocha et al., 2013). Contudo, é sabido que para ocorrer a sinalização pós-receptor, faz-se necessária a fosforilação do receptor do tipo I (Domenice et al., 2002).

Os receptores de HAM são expressos nas células de Leydig, e a ativação destes acarreta a supressão da diferenciação celular e da esteroidogênese. A diferenciação dos precursores das células de Leydig foi bloqueada em camundongos transgênicos com alta expressão para o HAM, acarretando assim queda do número de células de Leydig maduras (Racine et al. 1998).

Uma das diversas atuações do HAM ocorre na diferenciação sexual: no feto masculino as células de Leydig, a partir da oitava semana de gestação, secretam o hormônio testosterona (T) que, através da ação local, permitirá que os ductos de Wolff se diferenciem em epidídimos, ductos deferentes e vesículas seminais. O HAM é produzido pelas células de Sertoli não só na fase embriogênica (entre a 9^a e a 11^a semanas de prenhez), como também no final da gestação, após o nascimento e, ainda, no adulto. Todavia, a concentração decresce lentamente até atingir valores basais. No sexo masculino, o HAM secretado pelas células de Sertoli causa atrofia dos ductos de Müller, que são precursores do útero, cornos uterinos e da porção cranial da vagina. A ausência desse hormônio determina a diferenciação sexual feminina (Behringer et al., 1994; Mishina et al., 1996; Rey et al., 2003).

Achados recentes em equinos sugerem que concentrações séricas de HAM são significativamente maiores em potros recém-nascidos, quando comparados às potras e mais elevadas em potros pré-púberes do que em garanhões (Claes et al., 2013).

Um evento complexo que requer participação hormonal é o descenso testicular para a região inguinal. É sabido que o gene *Insl 3* (insulin-like factor 3) é especificamente expresso nas células de Leydig fetais e adultas, na espécie humana, participando da descida intra-abdominal dos testículos. Já a descida inguinoescrotal, é mediada pelos hormônios andrógenos e pelo HAM (Domenice et al., 2002). De acordo com teorias mais recentes de Josso et al. (2005), a parte abdominal da descida testicular é controlada pelo HAM e, a ausência deste ou anormalidades genéticas de seus receptores acarretam o desenvolvimento da

Síndrome do Ducto Persistente de Müller e/ou a criptorquidia, impedindo o descenso testicular normal.

Em garanhões, as concentrações séricas do HAM apresentaram-se superiores em animais criptorquídicos em relação aos garanhões inteiros ou castrados, logo, este hormônio poderá atuar como um biomarcador servindo como uma alternativa valiosa no diagnóstico endócrino para esses casos (Claes et al., 2013). A concentração plasmática pode vir a ser usada como um novo biomarcador para avaliar a existência de testículos criptorquídicos (Kitahara et al., 2012).

Nos machos, existe um remanescente vestigial do ducto de Müller, chamado de apêndice testicular (AT), situado no polo superior do testículo ou no sulco entre os testículos e os epidídimos (Atkinson Júnior et al., 1992). Em ratos, é sabido que o HAM é importante para determinação da espessura do músculo cremáster, mas não é essencial para a descida testicular (Bartlett et al., 2002). É sabido que o receptor do HAM do tipo II está presente no AT, mas, ainda não se sabe nenhuma função fisiológica para tal (Kistamás et al., 2013).

Outra atuação complexa do HAM está relacionada à presença deste hormônio em tumores. Sabe-se que, em animais adultos, esse se apresenta em valores basais. Contudo, este hormônio também pode estar em concentrações mais elevadas em mulheres que apresentam tumor ovariano de células da granulosa, podendo, desta maneira, atuar como um marcador específico e sensível, tanto na avaliação de cura como na recorrência precoce do tumor (Gustafson et al., 1992; Rey et al., 1996).

Experimentos conduzidos por Banco et al. (2012) e El-Sheikh Ali et al. (2013) a fim de investigar o HAM como um biomarcador sensível para o diagnóstico, não invasivo, de tumores das células de Sertoli em cães adultos e tumores das células da granulosa e teca, em bovinos, respectivamente. Ambos os autores concluíram que o HAM é, provavelmente, o biomarcador mais confiável e sensível para estes tipos de tumores.

A maturação das células de Sertoli, na puberdade de machos, pode ser caracterizada por marcadores como o HAM, seu receptor do tipo II e o receptor de andrógenos (RA). A expressão reduzida de HAM, pelas células de Sertoli, está intimamente relacionada com o aparecimento da espermatogênese nos túbulos seminíferos (Almeida et al., 2012). Essa maturação inclui a perda da atividade proliferativa, surgimento das junções intercelulares e oferece suporte à espermatogênese. Sugere-se que as concentrações circulantes de HAM permaneçam baixas durante os dois primeiros dias após o nascimento, mas elevam-se rapidamente e se mantêm assim, até a chegada da puberdade, decrescendo a valores basais em adultos (Josso et al., 1990; Lee et al., 1996).

Em cavalos, pareceu diminuir a expressão de HAM nas células de Sertoli, à medida que aumentava a expressão de RA, durante a maturação da função reprodutiva. Também nesta espécie, o HAM foi fortemente expresso nas células de Sertoli fetais, neonatais e em testículos pré-púberes, como nos testículos criptorquídicos de animais de 3 a 4 anos de idade, nos tumores de células de Sertoli e nas gônadas intersexuais masculinas (Bilinska et al., 2004; Ball et al., 2008).

Frente a esses achados, admite-se que o HAM possa constituir um eficiente biomarcador para machos, despontando como um método promissor na detecção de puberdade, algo complexo e ainda não totalmente compreendido pela ciência.

2.6 Hormônio anti-Mülleriano e Testosterona

Na espécie bovina, o início da puberdade está intimamente relacionado à habilidade das células de Leydig em responder ao estímulo do hormônio luteinizante (LH) produzindo testosterona que irá atuar controlando a diferenciação das células de Sertoli e várias de suas funções (Boockfor et al., 1983). O hormônio folículo luteinizante (FSH) também contribui com o processo de diferenciação das células de Sertoli e a síntese de fatores de crescimento por essas células que promovem a maturação das células de Leydig tornando-as aptas a responder aos estímulos crescentes do LH (Walker & Cheng, 2005).

Em um estudo realizado por Aguiar et al. (2006), os aumentos mais significativos das concentrações plasmáticas de T coincidiram com as mudanças morfológicas visualizadas no nucléolo e núcleo das células de Sertoli a partir da 26^a semana. Este achado encontra-se de acordo com o conhecimento de que a atividade das células de Leydig influencia a maturação das células de Sertoli através da secreção de T.

2.6.1 Período fetal e neonatal

Durante o período fetal e neonatal, as concentrações séricas de HAM e T, encontram-se elevadas. As células de Sertoli, responsáveis por secretarem o HAM, nestes momentos da vida, não expressam em suas membranas os receptores de andrógenos (RA), os quais a T, secretada pelas células de Leydig se ligam e através de uma ação parácrina, inibe a secreção do HAM (Boukari et al, 2009). Nestes períodos, os RA são expressos nas células de Leydig e células peritubulares (Chemes et al., 2008). Após o nascimento, os RA aumentam progressivamente na membrana das células de Sertoli (Rey et al., 2003). Destarte, a

insensibilidade androgênica apresentada pelas células secretoras de HAM, nestes momentos da vida, explica a coexistência em concentrações elevadas dos hormônios HAM e T.

Em garanhões, o HAM foi fortemente expresso em células de Sertoli de testículos imaturos, porém, diminuiu ou desapareceu nos adultos (Ball et al., 2008).

2.6.2 Período pré-púbere

Em camundongos o HAM regula a síntese de andrógenos quando presente em concentração elevada através da supressão da transcrição do gene P450c17. Este gene codifica a produção tanto da enzima 17,20 desmolase, quanto da enzima 17 α hidroxilase, ambas envolvidas na síntese da T. Desse modo, a alta concentração sérica de HAM controla a produção da T permanecendo o HAM em altas concentrações e a T em concentrações basais (Teixeira et al.; 1999). Em equinos, houve redução na expressão do RNAm para o HAM e seu receptor, concomitante com um aumento da expressão de RNAm para RA pelas células de Sertoli (Almeida et al.; 2012).

2.6.3 Período púbere e na fase adulta

Sugere-se que ocorra uma regulação antagônica entre o HAM e T, sendo que a T parece exercer um efeito supressor sobre a secreção do HAM pelas células de Sertoli. Nestes momentos, os RA já estão expressos na membrana das células de Sertoli e a T encontra-se em alta concentração intratesticular. Assim a T atua nos receptores de andrógenos, através da ação parácrina, inibindo a secreção do HAM pelas células de Sertoli (Pasqualini et al., 1981; Rey et al., 2003).

Em humanos, as concentrações séricas de HAM, em pacientes com puberdade tardia, apresentaram-se maiores que as observadas no controle para a idade. As crianças que atingiram a puberdade precocemente apresentaram valores inferiores de HAM quando comparados ao controle (Rey et al., 1993).

Um estudo foi conduzido por Young et al. (2005) em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico congênito, condição patológica associada à baixa concentração de T, enquanto a de HAM é anormalmente elevada. Estes pacientes, quando tratados com gonadotrofina coriônica humana e hormônio folículo estimulante recombinante, apresentaram redução significativa nas concentrações séricas de HAM. Já os pacientes com síndrome de insensibilidade androgênica moderada, que foram tratados da mesma forma daqueles que

apresentavam hipogonadismo hipogonadotrófico congênito, não apresentaram decréscimo na concentração sérica de HAM.

Diante desses resultados, pode-se inferir o papel crucial dos receptores de andrógenos na regulação do HAM pela T, uma vez que a alta concentração de T intratesticular atua via RA nas células de Sertoli, em uma ação parácrina, sendo o mais potente inibidor de HAM.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, A.K.; ALI, A. Developmental changes of Bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. **Reproduction Domestic Animals**, v.40, p.23-27, 2005.
- AGUIAR, G.V.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1629-1638, 2006.
- ALMEIDA, J.; CONLEY, A.J.; MATHEWSON, L.; BALL, B.A. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. **Theriogenology**, v.77, p.847-857, 2012.
- APONTE, P.M.; ROOIJ, D.G.; BASTIDAS, P. Testicular development in Brahman bulls. **Theriogenology**, v. 64, p.1440-1455, 2005.
- ARAVINDAKSHAN, J.P.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A. P.; PIERSON, R.A.; RAWLIIS, N.C. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. **Theriogenology**, v.54, p.339-354, 2000.
- ARGER, P.H.; MULHERN, C.B.; COLEMAN, B.G.; POLLACK, H.M.; WEIN, A.; KOSS J.; ARENSON R.; BANNER M. Prospective analysis of the value of scrotal ultrasound. **Radiology**, v.141, p.763-766, 1981.
- ATKINSON JÚNIOR, G.O.; PATRICK, L.E.; BALL JÚNIOR, T.I.; STEPHENSON, C.A.; BROECKER, B.H.; WOODARD, J.R.. The normal and abnormal scrotum in children: evaluation with color Doppler sonography. **American Journal of Roentgenology**, v.158, p.613-617, 1992.
- BAARENDS, W.M.; VAN HELMOND, M.J.; POST, M.; VAN DER SCHOOT, P.J.; HOOGERBRUGGE, J.W.; DE WINTER, J.P.; UILENBROEK, J.T.; KARELS, B.; WILMING, L.G.; MEIJERS, J.H.; THEMME, A.P.N.; GROOTEGOED, J.A. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. **Development**, v.120, p.189-197, 1994.
- BAILEY, T.L.; MONKE, D.R.; HUDSON, R.S. WOLFE, D.F.; CARSON, R.L.; RIDDELL, M.G. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. **Theriogenology**, v.46, p.881-887, 1996.
- BAILEY, T.L.; HUDSON, T.S.; POWE, T.A. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, p.581-598, 1998.
- BALL, B.A.; CONLEY, A.J.; GRUNDY, S.A.; SABEUR, K.; LIU, I.K. Expression of anti-Müllerian hormone (HAM) in the equine testis. **Theriogenology**, v.69, p.624-631, 2008.
- BANCO, B.; VERONESI, M.C.; GIUDICE, C.; ROTA, A.; GRIECO V. Immunohistochemical evaluation of the expression of Anti-Müllerian hormone in mature,

- immature and neoplastic canine sertoli cells. **Journal of Comparative Pathology**, v.146, p.18-23, 2012.
- BARBER, K.A.; ALMQUIST, J.O. Growth and feed efficiency and her relationship to puberal traits of Charolais bulls. **Journal Animal Science**, v.40, p.288-301, 1975.
- BARTH, A.D.; OMINSKI, K.H. The relationship between scrotal circumference at weaning and at one year of age in beef bulls. **The Canadian Veterinary Journal**, v.41, p.541-546, 2000.
- BARTLETT, J.E.; LEE, S.M.; MISHINA, Y.; BEHRINGER, R.R.; YANG, N. ET AL. Gubernacular development in Müllerian inhibiting substance receptor-deficient mice. **BJU International**, v.89, p.113-118, 2002.
- BEHRINGER, R.R.; FINEGOLD, M.J.; CATE, R.L. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual. **Developmental Cell**, v.79, p.415-425, 1994.
- BILINSKA, B.; HEJMEJ, A.; PAWLAK, M.; SADOWSKA, J.; TISCHNER, M. Immunoexpression of androgen receptors in testes of immature and mature stallions. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.539-543, 2004.
- BIRD, K.; ROSENFELD A.T. Testicular infarction secondary to acute inflammatory disease: Demonstration by B-scan ultrasound. **Radiology**, v.152, p.785-788, 1984.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer-Medicin**, v.25, p.383-391, 1973.
- BOOCKFOR, F.R.; BARNES, M.A.; DICKEY, J.F. Effects of unilateral castration and unilateral cryptorchidism of the Holstein bull on *in vitro* Leydig cell response. **Journal of Animal Science**, v.56, p.1386-1392, 1983.
- BOUKARI, K.; MEDURI, G.; BRAILLY-TABARD, S.; GUIBOURDENCHE, J.; CIAMPI, M.L.; MASSIN, N. MARTINERIE, L.; PICARD, J.Y.; REY, R.; LOMBÈS, M.; YOUNG, J. Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.94, p.1818-1825, 2009.
- BRINKS, J.S. Genetics of fertility in bulls. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF THERIOGENOLOGY, 1987, Austin, Proceed. Hasting, Society for **Theriogenology**, p.56-63, 1987.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; WILDE, R.E.; KASTELIC, J.P. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. **Theriogenology**, v.77, p.1398-1405, 2012a.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; WILDE, R.E.; KASTELIC, J.P. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. **Theriogenology**, v.78, p.69-76, 2012b.
- CAMPBELL, B.K.; CLINTON, M.; WEBB, R. The role of Anti-Müllerian hormone (HAM) during follicle development in a monovulatory species (sheep). **Endocrinology**, v.153, p.4533-4543, 2012.
- CARDILLI, D.J.; TONIOLLO, G. H.; PASTORE, A.A.; CANOLA, J.C.; MERCADANTE, M.E.Z. Alterações do padrão ultrassonográfico do parênquima testicular em bovinos jovens da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p. 367-370, 2009.
- CARDILLI, D.J.; TONIOLLO, G.H.; PASTORE, A.A.; CANOLA, J.C.; MERCADANTE, M.E.Z.; OLIVEIRA, J.A. Padrão ultrassonográfico do parênquima, mediastino e túnicas testiculares em bovinos jovens da raça Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.899-905, 2010.
- CARDILLI, D.J.; TONIOLLO, G.H.; PASTORE, A.A.; CANOLA, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; MERCADANTE, M.E.Z. Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça Nelore

- criados em sistema extensivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.75-82, 2012.
- CARMO, A.S.; OSÓRIO, J.P.; GOMES, R.S. Parâmetros do desenvolvimento de machos Guzerá criados na região do cerrado a pasto com suplementação volumosa na seca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2007, Curitiba-PR, **Anais...** Curitiba: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, p.48, 2007.
- CARTEE, R.E.; POWE, T.A.; GRAY, B.W.; HUDSON, R.S.; KUHLLERS, D.L. Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.2543-2548, 1986.
- CARTEE, R.E.; GRAY, B.W.; POWE, T.A.; HUDSON, R.S.; WHITESIDES, J. Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. **Theriogenology**, v.31, p.1149-1157, 1989.
- CARVALHO, C.F. **Bases físicas da formação da imagem ultrassonográfica**. In: Ultrassonografia em pequenos animais. Roca, São Paulo, p.1-8, 2004.
- CHACÓN, J.C.; PEREZ, E.; MULLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica **Theriogenology**, v.52, p. 221-231, 1999.
- CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B.C.; PIERSON, R.; BEARD, A.P.; RAWLING, N. Assessment of development of the testes and accessory gland by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v.48, p.119-132, 1997.
- CHEMES, H.E.; REY, R.A.; NISTAL, M.; REGADERA, J.; MUSSE, M.; GONZÁLEZ-PERAMATO, P.; SERRANO, A. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. **The Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, p.4408-4412, 2008.
- CLAES, A.; BALL, B.A.; ALMEIDA, J.; CORBIN, C.J.; CONLEY, A.J. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. **Theriogenology**, v.79, p.1229-1235, 2013.
- COSTA, M.F.O. **Precocidade sexual de bovinos da raça Nelore. IGF1, testosterona e motilidade espermática. 1999, 67p. Dissertação de Mestrado em Fisiologia** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- COSTA E SILVA, E.V.; FERREIRA, B.X.; QUEIROZ, V.L.D.; COSTA FILHO, L.C.C.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Precocidade sexual de touros a campo em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.97-104, 2013.
- COULTER, G.H.; LARSON, L.L.; FOOTE, R.H. Effect of age on testicular growth and consistency of Holstein and Angus bulls. **Journal Animal Science**, v.41, p.1383-1389, 1975.
- COULTER, G.H.; FOOTE, R.H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: A review. **Theriogenology**, v.11, p.297-311, 1979.
- DIAS, L.T.; EL FARRO, L.; ALBUQUERQUE, L.C. Estimativas de herdabilidade para perímetro escrotal de animais da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1878-1882, 2003.
- DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; EMERICK, L.L.; VALE FILHO, V.R. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.53-59, 2008.
- DI CLEMENTE, N.; WILSON, C.; FAURE, E.; BOUSSIN, L.; CARMILLO, P.; TIZARD, R.; PICARD, J.Y.; VIGIER, B.; JOSSO, N.; CATE, R. Cloning, expression, and alternative

- splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. **Molecular Endocrinology**, v.8, p. 1006-1020, 1994.
- DOMENICE, S.; COSTA, E.M.S.; CORRÊA, R.V.; MENDONÇA, B.B. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual (revisão). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.46, p. 433-443, 2002.
- EILTS, B.E.; PECHMAN, R.D.; HEDLUND, C.S.; KREEGER, J.M. Use of ultrasonography to diagnose Sertoly cell neoplasia and cryptorchidism in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.192, p.534-534, 1988.
- EL-SHEIKH ALI, H.; KITAHARA, G.; NIBE, K., YAMAGUCHI, R.; HORII, Y.; ZAABEL, S.; OSAWA, T. Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. **Theriogenology**, v.80, p.940–949, 2013.
- FONSECA, V.O.; FRANCO, C.S.; BERGMANN, J.A.G. Potencial reprodutivo de touros Nelore em monta natural. Proporção touro:vaca 1:80 em acasalamentos coletivos. Taxa de fertilidade e aspectos econômicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.77-82, 2000.
- FRANCO, C.S.; FONSECA, V.O.; GASTE, L. Potencial reprodutivo de touros Nelore acasalados coletivamente na proporção de um touro para 100 vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.1156-1161, 2006.
- FRENEAU, G.E. **Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Holandeses-PB e mestiços F1 Holandês x Gir dede os seis até os 21 meses de idade (Puberdade e pós-puberdade). 1991, 194p. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 1991.**
- FRENEAU, G.E. **Biopsia testicular aberta efetuada na puberdade e na pós-puberdade e suas consequências sobre a gametogênese e o sêmen de touros Nelore. 1996, 167p. Tese de Doutorado em Ciência Animal – Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 1996.**
- GARCIA, J.M.; PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **Ars Veterinária**, v.3, p.47-53, 1987.
- GIULI, G.; SHEN, W.H.; INGRAHAM, H.A. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. **Development**, v.124, p.1799-1807, 1997.
- GODDARD, P.J. **General principles**. In: *Veterinary ultrasonography*, 1 ed., Cabi, Aberdeen - Scotland, p.1-19, 1995.
- GUSTAFSON, M.L.; LEE, M.M.; SCULLY, R.E.; MONCURE, A.C.; HIRAKAWA, T.; GOODMAN, A., ET AL. Müllerian inhibiting substance as a marker for ovaries sex-cord tumor. **The New England Journal of Medicine**, v.326, p.466-471, 1992.
- GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive Biology. **Journal Animal Science**, v.70, p.953-972, 1992.
- HAHN, J.; FOOTE, R. H.; SEIDEL, G. E. Jr. Testicular growth and sperm output in dairy bulls. **Journal Animal Science**, v.29, p.41-47, 1969.
- HERRING, D.S.; BJORNTHON, R.D.M.S. Physics facts and artifacts of diagnostic ultrasound. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.15, p.1107-1122, 1985.
- HILDEBRANDT, T.B.; HERMES, R.; JEWGENOD, K.; GORITZ, F. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. **Theriogenology**, v.53, p.73-84, 2000.

- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Quantificação dos estádios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com e sem qualidade de sêmen. **Ciência Rural**, v.33, p.1111-1115, 2003.
- JOSSO, N.; LEGEAI, L.; FOREST, M.G.; CHAUSSAIN, J.L.; BRAUNER, R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.70, p.23–27, 1990.
- JOSSO, N.; BELVILLE, C.; DI CLEMENTE, N.; PICARD, J.Y. HAM and HAM receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome. **Human Reproduction Update**, v.11, p.351–356, 2005.
- KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; PIERSON, R.A.; COULTER, G.H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.65, p.111-115, 2001.
- KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.368-373, 2008.
- KASTELIC, J.P.; BRITO, L.F.C Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 3, p.45–51, 2012.
- KILLIAN, G.J.; AMANN, R.P. Reproductive capacity in beef bulls: IX. Changes in reproductive organ weights and semen characteristics of Holstein bulls during the first thirty weeks after puberty. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.1631-1635, 1972.
- KISTAMÁS, K.; RUZSNAVSKY, O.; TELEK, A.; KOSZTKA, L.; KOVÁCS, I.; DIENES, B.; CSERNOCH, L.; JOZSÁ, T. Expression of anti-Müllerian hormone receptor on the appendix testis in connection with urological disorders. **Asian Journal of Andrology**, v.15, p.400-403, 2013.
- KITAHARA, G.; EL-SHEIK ALI, SATO, T.; KOBAYASHI, I.; HEMMI, K.; SHIRAO, Y.; KAMIMURA, S. Anti-Müllerian hormone (AMH) profiles as a novel biomarker to evaluate the existence of a functional cryptorchid testis in Japanese Black Calves. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p. 310-315, 2012.
- LANE A.H.; DONAHOE, P.K.. New insights into Müllerian inhibiting substance and its mechanism of action. **Journal of Endocrinology**, v.158, p.1-6, 1998.
- LEE, M.M.; DONAHOE, P.K.; HASEGAWA, T.; SILVERMAN, B.; CRIST, G.B.; BEST, S.; ET AL. Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.81, p.571–576, 1996.
- LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; BERGMANN, J.A.G.; TORAL, F.L.; BOSORIO, J.O.; CARMO A.S.; MENDONÇA L.F.; MOUSTACAS V.S., HENRY M. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzerat bulls raised under grazing conditions. **Theriogenology**, v.15, p.751-759, 2013.
- LUNSTRA, D.D.; FORD, J.J.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, v.46, p.1054-1062, 1978.
- LUNSTRA, D.D.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, v.55, p.638-648, 1982.
- MAKARECHIAN, M.; FARID, A.; BERG, R.T. Relationships between growth parameters and scrotal circumference in young beef bull. **Theriogenology**, v.22, p.667-674, 1984.
- MAKARECHIAN, M.; FARID, A.; BERG, R.T. Scrotal circumference, semen characteristics, growth parameters and their relationships in young beef bulls. **The Canadian Journal of Animal Science**, v.65, p.789-798, 1985.
- HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal/Colégio brasileiro de reprodução animal**, 2 ed, Belo Horizonte, 49p., 1998.

- MARTIN, L.C.; BRINKS, J.C.; BOURDON, R.M.; CUNDIFF L.V. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal Animal Science**, v.70, p.4006-4014, 1992.
- MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.B. Estimates of genetic correlations between sire scrotal circumference and offspring age at first calving in Nelore cattle. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.209-212, 1991.
- MISHINA, Y.; REY, R.; FINEGOLD, M.J.; MATZUK, M.M.; JOSSO, N.; CATE, R.L. BEHRINGER, R.R. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. **Genes & Development**, v.10, p.2577–2587, 1996.
- MOURA, J.C.; MERKT, H. **A ultrassonografia na reprodução equina**. 2 ed, Editora Universitária Americana, Salvador, 162p., 1996.
- MOURA, A.A.; RODRIGUES, G.C.; MARTINS FILHO, R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.934-943, 2002.
- NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.361-372, 2004.
- OSÓRIO, J.P.; MARC, H.; BERGMANN, J.A.G.; CARMO, A.S.; SOUZA, F.A. Desenvolvimento testicular e puberdade em machos da raça guzerá da desmama aos 36 meses de idade criados no cerrado mineiro. **Revista de Medicina Veterinária**, n.24, p.9-24, 2012.
- PASQUALINI, T.; CHEMES, H.; RIVAROLA, M.A. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. **Clinical Endocrinology**, v.15, p.545–554, 1981.
- PASTORE, A.A. **Contribuição da ultrassonografia na avaliação andrológica de bovinos Nelore**. 2008, 63p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal, 2008.
- PECHMAN, R.D.; EILTS B.E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**, v.27, p.431-441, 1987.
- PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S.; KROETZ, I.A. Produtividade à desmama de novilhas Nelore e F1 *Bos taurus* x Nelore e *Bos indicus* x Nelore [Productivity to weaning of Nelore and F1 Guzerath x Nelore and *Bos taurus* x Nelore Heifers]. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1712–1719, 2001.
- PINHO, R.O.; COSTA, D.S.; SIQUEIRA, J.B.; MARTINS, L.F.; TEIXEIRA, L.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Lack of relationship between testicular echotexture and breeding soundness evaluation in adult Nelore bulls. **Livestock Science**, v.154, p.246–249, 2013.
- PUGH, C.R.; KONDE, L.J.; RARK, R. D. Testicular ultrasound in the normal dog. **Veterinary Radiology e Ultrasound**, v.31, p.195-199, 1990.
- QUEIROZ, V.L.D.; MACEDO, G.G.; FERNANDES, C.E.S; FERREIRA, B.X.; SOUZA, C.C.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. Achados histológicos em testículos de bezerros Nelore pré-púberes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2013, Uberlândia-MG. **Anais...** Uberlândia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 250, 2013.
- QUIRINO, C.R.; BERGMANN, J.A.G.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; PEREIRA, J.C.C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. **Theriogenology**, v.52, p.25-34, 1999a.
- QUIRINO, C.R.; BERGMANN, J.A.G.; VALE FILHO, V.R. Estudo da variabilidade genética de características reprodutivas em touros da raça Nelore. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.7, p.63-74, 1999b.
- RACINE, C.; REY, R.; FOREST, M.G.; LOUIS, F.; FERRÉ, A.; HUHTANIEMI, I.; et al. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on

- steroidogenesis and cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.594–599, 1998.
- REY, R.A.; LORDEREAU-RICHARD, L.; CAREL, J.C.; BARBET, P., CATE, R.L.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J.L.; JOSSO, N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, v.77, p.1220-6, 1993.
- REY, R.A.; LHOMMÉ, C.; MARCILLAC, L.; LAHLOU, N.; DUVILLARD, P.; JOSSO, N.; BIDART, J.M. Anti-müllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of ovary: Comparative study with serum a-inhibin and estradiol. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.174, p. 958-65, 1996.
- REY, R.; LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; BEDECARRÁS, P. HAM/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.211, p.21–31, 2003.
- RIBADU, A.Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: a review. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, p.13-28, 1999.
- ROCHA, R.M.P.; ALVES, A M.C.V.; LIMA, L.F.; ARAÚJO V.R.; BERNUCI, M. P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO J.R. Regulação da função ovariana: caracterização estrutural e papel do hormônio anti-mülleriano (HAM). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1138, 2013.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2005, Goiânia-GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.1-9, 2005.
- SAKAMOTO, H.; SAITO, K.; SHICHIZYO, T.; ISHIKAWA, K.; IGARASHI, A.; YOSHIDA, H. Color Doppler ultrasonography as a routine clinical examination in male fertility. **International Journal of Urology**, v.13, p.1073-1079, 2006.
- SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R.; SILVA, A.S.; COSTA E SILVA E.V. SILVA. Avaliação da libido de touros Nelore adultos em curral e sua associação com características andrológicas e desempenho reprodutivo a campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.588-593, 2003.
- SÁNCHEZ, R.; ALFONSO, E. Ultrasonografia na reprodução animal. **TecnoVet**, v.1, p.6, 2000.
- SARREIRO, L.C.; BERGMANN, J.A.G.; QUIRINO, C.R.; PINEDA, N.R.; FERREIRA, V.C.P.; SILVA, M.A. Heritability and genetic correlation between scrotal circumference, libido and seminal traits in Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.602-608, 2002.
- SIDDIQUI, M.A.R.; BHATTACHARJEE, J.; DAS, Z.C.; ISLAM, M.M.; ISLAM, M.A.; HAQUE, M.A.; PARRISH, J.J.; SHAMSUDDIN. M. Crossbred bull selection for bigger scrotum and shorter age at puberty with potentials for better quality semen. **Reproduction Domestic Animals**, v.43, p.74–79. 2008.
- SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; FREITAS, A.R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1157-1165, 2002.
- SIMON, S.D.; LEE R.D.; MULHALL J.P. Should all infertile males undergo urologic evaluation before assisted reproductive technologies? Two cases of testicular cancer presenting with infertility. **Fertility and Sterility**, v.75, p.1226-1227, 2001.
- SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; PINHO, R.O. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.3-13, 2013.

- TEIXEIRA, J.; FYNN-THOMPSON, E.; PAYNE, A.H.; DONAHOE, P.K. Müllerian inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. **Endocrinology**, v.140, p.4732-738, 1999.
- TOELLE, V.D.; ROBISON, O.W. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. **Journal Animal Science**, v.60, p.89-100, 1985.
- TORRES JÚNIOR, J. R.; HENRY, M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction**, v.2, p.114-121, 2005.
- UNANIAN, M.M. Uso de marcadores moleculares na busca de características relacionadas à produção animal. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 1999, Brasília, **Anais...** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.8, 1999.
- VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; QUIRINO, C.R.; GRAÇA, D.S.; BERGMANN, J.A.G.; SALVADOR, D.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; REIS, S.R. Perfil andrológico de touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) de um a dois anos de idade, criados extensivamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.25, p.189-192, 2001.
- VIANA, J.H.M.; BARRETO FILHO, J.B.; ALBUQUERQUE, F.T. **Ultrassom: Ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva**. In: LOPES, M. A. (Ed.) Curso de manipulação do ciclo estral em bovinos de corte. Lavras: UFLA/FAEPE, p.1-33, 2004.
- VIU, M.A.O.; MAGNABOSCO, C.U.; FERRAZ, H.T.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; LOPES, D.T.; VIU, A.M.F. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região Centro Oeste do Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.53-57, 2006.
- WALKER, W.H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v.130, p.15-28, 2005.
- WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. **Journal Animal Science**, v.224, p.761-765, 1965.
- YOKOO, M.J.; MAGNABOSCO, C.U.; ROSA, G.J.M.; LÔBO, R.B.; ALBUQUERQUE, L.G. Características reprodutivas e suas associações com outras características de importância econômica na raça Nelore, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p. 91-100, 2012.
- YOUNG, J.; CHANSON, P.; SALENAVE, S.; NOEL, M.; BRAILLY, S.; O'FLAHERTY, M SCHAISON, G.; REY, R. Testicular anti-mullerian hormone secretion is stimulated by recombinant human FSH in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, p.724-728, 2005.

4. OBJETIVOS

- 1) Verificar a correlação entre a concentração sanguínea de hormônio anti-Müllerino e testosterona com a precocidade sexual de machos bovinos zebuínos;
- 2) Determinar a relação do hormônio anti-Müllerino com a puberdade;
- 3) Avaliar a eficiência do estudo ultrassonográfico dos testículos para a definição da idade à puberdade;

Hormônio anti-Mülleriano sérico como preditor da puberdade de touros jovens Nelore Serum anti-Müllerian hormone as a predictor of puberty in Nelore young bulls

Vanessa Lopes Dias Queiroz⁽¹⁾, Eliane Vianna da Costa e Silva⁽²⁾

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, Av. Senador Filinto Muller, 2443- Campo Grande – MS, e-mail: vanessalopq@hotmail.com

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, e-mail: eliane.silva@ufms.br

RESUMO - Este estudo foi realizado para verificar a correlação entre a concentração sanguínea de hormônio anti-Mülleriano (HAM) e testosterona (T) com a precocidade sexual de machos bovinos zebuínos, determinar a relação do HAM com a puberdade e avaliar a eficiência do estudo ultrassonográfico dos testículos para a definição da idade à puberdade. *Bos indicus* (Nelore, n = 37), com 10 a 16 meses de idade, foram submetidos a pesagens, biometria testicular, coletas de sangue e sêmen e exames de ultrassonografia testicular, em coletas trimestrais de dados (julho, outubro e janeiro). Os animais foram classificados em púberes e não púberes. A partir dos animais púberes, definiu-se a classe de precocidade sexual em touros superprecoces incluindo aqueles que atingiram a puberdade até 13 meses de idade (n = 5); precoces, aqueles que atingiram a puberdade entre 14 e 16 meses (n = 21) e tardios como aqueles que alcançaram a puberdade após 16 meses (n = 11). A classe de precocidade sexual foi positivamente correlacionada com a variação observada nas concentrações séricas de HAM (r = 0,5145; P = 0,0001) o que não ocorreu entre a classe de precocidade e T (r = -0,1483, P > 0,05). Os animais superprecoces apresentaram uma menor média na concentração circulante de HAM (6,13 ± 0,64), ao decorrer das coletas, diferentemente dos animais precoces (12,14 ± 2,63) e tardios (47,64 ± 5,74). Na distinção da classe de puberdade, o perímetro escrotal se mostrou mais eficiente em diferenciar os animais púberes dos não púberes (r = 0,7770; P = 0,0001) quando comparado ao HAM (r = -0,3500; P = 0,0002). Os animais não púberes apresentaram uma menor média de ecogenicidade testicular (113,47 ± 3,69) quando comparado aos púberes (150,95 ± 2,58). Conclui-se que o HAM pode ser um marcador endócrino efetivo na distinção dos animais superprecoces dos animais tardios com uma única coleta sanguínea, na desmama e concentração, aproximadamente, de cinco ng/mL. A avaliação ultrassonográfica dos testículos se mostrou eficiente na distinção dos animais púberes dos não púberes, porém não se correlacionou com a precocidade sexual.

Palavras-chave: endocrinologia, precocidade sexual, testosterona, touros, ultrassonografia testicular.

ABSTRACT – This study was conducted to examine the correlation among serum anti-Müllerian (AMH) and testosterone (T) hormones concentration with sexual precocity of Nelore young bulls; also, determine the relationship of AMH with puberty and evaluate the efficiency of testis ultrasonography defining the age at puberty. *Bos indicus* (Nelore, n = 37), 10 to 16 months of age, underwent weighing, scrotal circumference, blood samples and semen collected and ultrasonography of the testis, quarterly data collection (July, October and January). The animals were classified as pubertal and not pubertal. From the pubertal animals, they were classified according the class of sexual precocity in super maturing animals which included those who reached puberty before 13 months of age (n = 5); maturing bulls, those who reached puberty between 14 and 16 months (n = 21) and late bulls as those who reached puberty after 16 months (n = 11). Class of sexual maturity was positively correlated with variation in serum AMH (r = 0.5145, P = 0.0001) which did not occur between the class of precocity and T (r = -0.1483, P > 0.05). The super maturing animals showed a lower mean in the circulating concentration of AMH (6.13 ± 0.64) in all collections, unlike the animals maturing (12.14 ± 2.63) and late bulls (47.64 ± 5.74). Distinction in the class of puberty, scrotal circumference was more efficient in differentiating non-pubescent of pubescent animals (r = 0,7770; P = 0,0001) when compared to the HAM (r = -0,3500; P = 0,0002). Non-pubertal animals had a lower mean testicular echogenicity (113.47 ± 3.69) compared to pubescent (150.95 ± 2.58). In conclusion, the AMH may be an effective endocrine marker in distinguishing from late bulls of super maturing bulls with a single blood collection, at weaning and concentration approximately five ng/mL. Moreover, the ultrasonography evaluation of the testis proved effective in distinguishing pubertal animals of not pubescent, but not correlated with sexual precocity.

Keywords: bulls, endocrinology, reproductive precocity, testicular ultrasonography, testosterone,

1. Introdução

A antecipação da puberdade pode ter uma representação relevante na taxa de desfrute de um rebanho ao proporcionar a diminuição da idade de entrada dos animais em reprodução. Além disso, a seleção de touros na idade mais precoce possível proporciona a aceleração do melhoramento genético do rebanho principalmente via a diminuição do intervalo entre gerações. Isso, conseqüentemente, resulta em aumento da lucratividade dos diferentes sistemas de produção animal [1]. Esta característica de média herdabilidade pode apresentar resposta à seleção, razão pela qual é utilizada nos programas de melhoramento genético [2].

Recentemente, tem-se tentado agregar diversos outros recursos na seleção da precocidade sexual, tais como ultrassonografia da genitália, métodos de avaliação da integridade e eficiência biológica da célula espermática e identificação de marcadores biológicos para eficiência reprodutiva [3].

Um método promissor é a quantificação do hormônio anti-Mülleriano (HAM), que poderá atuar como um biomarcador para uma possível detecção da puberdade precoce em touros. Ele é secretado pelas células de Sertoli e é responsável pela regressão dos ductos de Müller [4,5]. O HAM pertence à superfamília do fator transformador de crescimento (TGF- β) [6]. É formado por uma proteína precursora homodimérica, com massa molecular de 140 kDa, que após clivagem proteolítica, resulta em um fragmento inativo de 110 kDa e outro, biologicamente ativo, de 25 kDa [7].

Em seres humanos o HAM já é utilizado como marcador de puberdade precoce e tardia. É conhecido que, durante a puberdade e na idade adulta, o HAM sérico é negativamente regulado pela testosterona (T) secretada pelas células de Leydig, uma vez que a concentração do HAM diminui drasticamente nos túbulos seminíferos e a de testosterona aumenta; deste

modo, a T parece ter um efeito supressor sobre a secreção de HAM pelas células de Sertoli através de uma ação parácrina [8]. Relatos de Almeida et al. [9] registraram uma redução na expressão do RNAm para o HAM e seu receptor, concomitante com um aumento da expressão de RNAm para receptores de andrógenos (RA) pelas células de Sertoli, em equinos. Entretanto, em bovinos, este efeito antagônico ainda não foi investigado.

Em busca da identificação de animais sexualmente precoces em gado de corte, a técnica da ultrassonografia testicular vem sendo utilizada durante o desenvolvimento sexual para estudar alterações no parênquima [10]. Além disso, a imagem computadorizada dos testículos foi associada à puberdade, através do aumento na ecogenicidade testicular atribuído à proliferação celular e ao maior número de células maduras na espermatogênese [11]. A ultrassonografia, portanto, pode ser usada como técnica complementar ao exame clínico, auxiliando no diagnóstico de problemas de infertilidade, possibilitando decisões rápidas e tratamentos apropriados [12].

A respeito destes antecedentes, observa-se escassez de informação sobre a atuação do HAM sérico sobre a precocidade sexual em bovinos. Assim, o presente estudo foi delineado para observar a correlação entre a concentração do HAM e da T com a precocidade sexual, de machos bovinos zebuínos; determinar a relação do HAM com a puberdade e avaliar a eficiência do estudo ultrassonográfico dos testículos para a definição da idade à puberdade. As hipóteses avaliadas foram: 1) durante o período pré-púbere as concentrações séricas de HAM são superiores às de T e na puberdade há uma queda nas concentrações circulantes de HAM enquanto às de T tornam-se superiores; 2) o HAM pode atuar como um possível biomarcador de precocidade sexual 3) A ultrassonografia testicular é eficiente na detecção da puberdade em *Bos indicus* (Nelore).

2. Material e Métodos

2.1. Animais e procedimentos

Os trabalhos de campo foram realizados no município de Rio Brillhante, Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 21°45'15" S, longitude 54° 25'50" W), em uma propriedade que desenvolve uma grande pressão de seleção para características de precocidade sexual. *Bos indicus* (Nelore) eram mantidos em pastos de *Brachiaria brizantha cv marandu*, recebiam suplementação mineral *ad libitum* e 0,5kg de ração comercial. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), mediante autorização do Comitê de ética do uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. A manipulação dos animais durante a fase experimental foi realizada dentro de um projeto maior aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, intitulado “Desenvolvimento de critérios de seleção de touros Nelore precoce” sob o protocolo número 118 /2006.

2.2. Delineamento experimental

Bezerros Nelore contemporâneos (*Bos indicus*, n = 37), foram avaliados entre 10 e 16 meses de idade, em coletas trimestrais de dados (Julho, Outubro, Janeiro). Nestas ocasiões foram feitas pesagens, biometria testicular, coletas de sangue e sêmen e realizados exames de ultrassonografia testicular de todos os animais. A biometria testicular foi realizada por meio de paquímetro, mensurando-se comprimento (cm) e largura (cm) e, por meio de fita métrica metálica milimetrada na posição mediana do escroto, aferiu-se o perímetro escrotal (PE), expresso em centímetros. Para calcular o volume testicular foi utilizada a expressão

preconizada por Fields et al.[13] para formato cilíndrico, sendo volume = $2 [(r^2) \times \pi \times h]$, em que: r = raio da largura testicular (L/2); π (Pi) = 3,1416 e h = comprimento testicular. Os bezerros que apresentaram PE ≥ 19 cm foram submetidos à eletroejaculação.

A motilidade progressiva e o vigor foram estimadas em microscopia óptica de campo claro, sob aumento de X 200, utilizando lâmina coberta por lamínula, previamente aquecida e mantida a 37°C. A concentração espermática foi estimada através da câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase sob aumento de X 400. A análise da morfologia espermática foi realizada em microscópio de contraste de fase sob aumento de X 1000.

A partir do conceito de puberdade proposto por Wolf et al. [14], em que o animal púbere é aquele que apresenta motilidade progressiva $\geq 10\%$ e concentração espermática total $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides no ejaculado, os animais foram classificados em púberes e não púberes. A partir dos animais púberes, definiu-se a classe de precocidade sexual em touros superprecoces (SP) incluindo-se aqueles que atingiram a puberdade até 13 meses de idade, n = 5; precoces (P), aqueles que atingiram a puberdade entre 14 e 16 meses, n = 21; e tardios (Td), aqueles que alcançaram a puberdade após 16 meses, n = 11.

2.3. Ultrassonografia testicular

Exames ultrassonográficos testiculares foram realizados utilizando uma unidade portátil de ultrassom equipado com um transdutor linear de 7.5 MHz de frequência (Chison 500vet, Chison Medical Imaging Co., Coreia do Sul). As configurações de foco, brilho e contraste foram padronizadas para todas as coletas. Posicionou-se o transdutor em cada testículo nos planos transverso-caudal e longitudinal-lateral, de modo que o mediastino fosse facilmente perceptível em cada imagem. As imagens foram congeladas e gravadas em disco rígido móvel, por um assistente de captura de imagens. A ecotextura testicular média (ECOt) foi

determinada a partir da imagem do parênquima testicular em cinco quadrados de 1 cm² definidos aleatoriamente, de acordo com Araviskdashan et al. [11], utilizando o *software* Image J [15].

2.4. Coleta de sangue e análises hormonais

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia ou artéria coccígea, utilizando-se tubos de vidros sem anticoagulante. As amostras foram imediatamente colocadas em gelo e posteriormente centrifugadas a 2.325 x g por 20 min, para a obtenção do soro, conforme Santos et al. [16]. O soro foi armazenado em microtubos (*eppendorf*) de 2 ml e as alíquotas foram devidamente identificadas. As amostras de soro foram congeladas a -18°C até a análise hormonal. O HAM (ng/mL) e a T (ng/mL) séricos foram avaliados através do método de Elisa, utilizando-se o kit comercial “Bovine AMH ELISA” (Ansh Labs[®], USA) e o “RIA Testosterone” (Immunotech[®], USA), respectivamente. A sensibilidade do ensaio do HAM e da T foi de 0,011 ng/mL e 0,04 ng/mL, respectivamente e intraensaios < 5%. A quantificação hormonal foi realizada no IGAC (Instituto Genese de Análise Científica, São Paulo, Brasil).

2.5. Análise estatística

Os dados de HAM, T, PE, ECOt, volume testicular, motilidade progressiva, vigor, defeitos espermáticos maiores, menores e totais foram submetidos à análise de variância pelo procedimento *SAS System for Windows* e são apresentados como médias ± erro padrão, considerando-se os efeitos fixos de idade, ordem de coleta (julho, outubro ou janeiro), classificação quanto à classe de puberdade e classe de precocidade, tendo como covariável o peso corporal. Compararam-se as médias por teste t de *student*. As variáveis expressas em

porcentagem foram transformadas para arcoseno $\sqrt{(x/100)}$. Para os estudos de correlação a significância foi determinada por Correlação de Pearson realizado PROC CORR do SAS 9.2 e PROC REG para obter as funções de regressão. As associações entre HAM, T, PE, ecotextura testicular, ordem de coleta, volume testicular, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, defeitos maiores, menores e totais foram avaliadas por meio de correlação de Pearson. Considerando-se as variáveis classificatórias, classe de puberdade e classe de precocidade sexual, procedeu-se a uma análise de regressão logística, incluindo-se no modelo os efeitos fixos de idade, HAM, T, volume testicular, ecotextura testicular e PE. Para todas as análises, diferenças com $P > 0,05$ foram consideradas não significativas.

3. Resultados

A análise de variância ($R^2 = 48,66$, $CV = 82,73\%$, $P = 0,0001$) exibiu um efeito significativo sobre a variação de HAM em função das classes de precocidade (Figura 1) e puberdade. No mesmo modelo adotado para a T ($R^2 = 35,75$, $CV = 96,41\%$, $P = 0,0001$) não se observou efeitos significativos de ordem de coleta (Figura 2), classe de puberdade, classe de precocidade e idade. A redução na concentração sérica de HAM foi intimamente relacionada ao surgimento da puberdade, no período total de coleta em que animais não púberes apresentaram média superior quando comparados aos púberes (Tabela 1).

Tabela 1. Médias (\pm erro padrão), dos três momentos de coleta – julho, outubro e janeiro, da concentração sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) e testosterona (T), perímetro escrotal (PE), volume testicular, ecotextura testicular (ECOt), motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, defeitos maiores, menores e totais de machos Nelore (n = 37) de acordo com a classe de puberdade.

Variáveis	Não púberes	Púberes
HAM (ng/mL)	31,93 \pm 3,41 ^a	10,18 \pm 1,53 ^b
T (ng/mL)	1,55 \pm 0,21 ^b	3,36 \pm 0,51 ^a
PE (cm)	20,67 \pm 0,32 ^b	28,29 \pm 0,45 ^a
Volume testicular (mm ³)	243 \pm 20,23 ^b	565,37 \pm 34,35 ^a
ECOt (pixel/cm ²)	113,47 \pm 3,69 ^b	150,95 \pm 2,58 ^a
Motilidade progressiva (%)	8,4 \pm 5,47 ^b	34,03 \pm 2,77 ^a
Vigor (1-5)	1,8 \pm 0,2 ^b	2,94 \pm 0,14 ^a
Concentração Espermática (10 ⁶ esp./mL)	10,30 \pm 6,20 ^b	183,53 \pm 41,71 ^a
Defeitos maiores (%)	64,40 \pm 5,95 ^a	50,72 \pm 5,65 ^b
Defeitos menores (%)	2,25 \pm 0,60 ^b	2,55 \pm 0,41 ^a
Defeitos totais (%)	58,55 \pm 6,35 ^a	53,27 \pm 5,55 ^b

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa (P<0,05) para teste t de *Student*.

HAM- hormônio anti-Mülleriano; T- testosterona; PE- perímetro escrotal; ECOt- ecotextura testicular.

Entre as classes de precocidade, os animais SP apresentaram a menor média dos três momentos, referente à concentração sérica do HAM, enquanto os animais tardios exibiram a maior média (Tabela 2).

Tabela 2. Médias (\pm erro padrão), dos três momentos de coleta – julho, outubro e janeiro, da concentração sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) e testosterona (T), perímetro escrotal (PE), volume testicular, ecotextura testicular, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, defeitos maiores, menores e totais de machos Nelore (n = 37) de acordo com a classe de precocidade sexual.

Variáveis	SP	P	Td
HAM (ng/mL)	6,13 \pm 0,64 ^c	19,14 \pm 2,63 ^b	47,65 \pm 5,74 ^a
T (ng/mL)	3,11 \pm 0,92 ^a	1,94 \pm 0,22 ^b	1,80 \pm 0,43 ^c
PE (cm)	25,93 \pm 1,17 ^a	23,08 \pm 0,53 ^b	20,83 \pm 0,67 ^c
Vol. testicular (mm ³)	543,55 \pm 70,31 ^a	402,38 \pm 34,13 ^b	257,60 \pm 37,20 ^c
ECOt (pixel/cm ²)	128,69 \pm 6,64 ^a	125,64 \pm 4,57 ^b	118,95 \pm 5,58 ^c
Mot. progressiva (%)	34,00 \pm 6,53 ^a	29,11 \pm 3,17 ^b	-
Vigor (1-5)	3,00 \pm 0,26 ^a	2,69 \pm 0,16 ^b	-
Conc. espermática (n x 10 ⁶ /mL)	287,20 \pm 108,14 ^a	110,34 \pm 26,87 ^b	-
Defeitos maiores (%)	48,30 \pm 11,22 ^b	54,58 \pm 5,36 ^a	-
Defeitos menores (%)	2,50 \pm 0,72 ^a	2,48 \pm 0,41 ^b	-
Defeitos totais (%)	50,80 \pm 10,89 ^b	55,86 \pm 4,77 ^a	-

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa (P<0,05) para teste t de *Student*.

SP - superprecoces; P - precoce; Td - tardios; HAM- hormônio anti-Mülleriano; T- testosterona; PE- perímetro escrotal; Vol. Testicular – volume testicular; ECOt- ecotextura testicular; mot. progressiva – motilidade progressiva; conc. espermática – concentração espermática.

A classe de precocidade sexual foi positivamente correlacionada com a variação observada nas concentrações séricas de HAM o que não ocorreu entre a classe de precocidade e T. Além disso, a classe de precocidade sexual se mostrou negativamente correlacionada com o PE, já que classe de precocidade foi dividida em animais tardios (1), precoces (2) e superprecoces (3). Tabela 3.

Para a classificação de puberdade, as variáveis fixas testadas mostraram-se significativas pela análise de regressão logística (Figuras 3 e 4), com a porcentagem de concordância variando entre 73,3% para o HAM e 96,3% para o PE. A variável PE é a que mais explica a dicotomização da classe, uma vez que em 96,3% dos casos ela consegue definir a puberdade. Este resultado ressalta que o PE mostra-se mais eficiente para a definição de puberdade. Tanto a queda observada nas concentrações séricas de HAM quanto à mensuração do PE apresentam uma probabilidade estimada de 50%, em diferenciar os animais púberes dos não púberes.

Para definição de precocidade sexual a maior porcentagem de concordância observada foi para a concentração sérica de HAM (81,6%; $P < 0,05$) apresentando, em uma análise pareada da regressão logística unindo os dados dos dois grupos em uma única regressão, SP x P (Figura 5), concordância de 81,4% e probabilidade estimada de distinguir os SP dos P de aproximadamente 55%.

A porcentagem de concordância dos animais SP x Td foi de 95,9% e uma probabilidade estimada em distinguir os animais SP dos Td de 90% (Figura 6). Na análise pareada dos animais P x Td a concordância apresentada foi de 78,8% e a probabilidade estimada em diferenciar os animais P dos Td, de aproximadamente 85% (Figura 7). A intensidade de pixel (Figura 8) e a T, não foram significativas para predizerem esta definição, não sendo eficientes para demonstrar estas variações, mesmo quando se trabalhou com as diferentes classes de precocidade sexual.

4. Discussão

Acredita-se que este seja o primeiro trabalho avaliando as concentrações séricas do HAM e T em touros nos momentos não púbere e púbere em *Bos indicus* (Nelore) e contribui com novas informações a respeito do HAM poder atuar como um biomarcador para precocidade sexual.

Os dados demonstraram que o HAM pode ser um marcador endócrino efetivo na distinção dos animais superprecoces dos animais tardios. Os resultados confirmam a hipótese que durante o período pré-púbere as concentrações séricas de HAM são superiores às de T, ocorrendo uma inversão destas concentrações quando a puberdade é atingida. Os animais superprecoces (SP) apresentaram baixa concentração sérica de HAM ao decorrer das coletas, diferentemente dos animais precoces e tardios. Crianças que apresentaram puberdade precoce demonstraram valores inferiores de HAM quando comparadas àquelas que apresentaram puberdade tardia Rey et al. [8]. Em potros pré-púberes a concentração sérica de HAM apresentou-se elevada quando comparada à de garanhões [18].

Nos resultados deste trabalho, os animais não púberes apresentaram a concentração sérica de HAM elevada, enquanto que a de T se encontrava em baixas concentrações. Altas concentrações circulantes de HAM são capazes de controlar a síntese de andrógenos através da supressão da transcrição do gene P450c17, que codifica tanto a produção da enzima 17,20 desmolase quanto da enzima 17 α hidroxilase, ambas envolvidas na síntese da testosterona [19]. Se o papel do HAM em humanos for similar no bovino, poderia explicar os achados deste estudo, o que sugeriria que o HAM seria mais efetivo quando comparado a T para a definição da etapa pré-púbere.

Durante a puberdade e na fase adulta, observa-se na espécie humana, uma regulação antagônica entre o HAM e a T, em que a T parece, neste momento, exercer um efeito supressor sobre a secreção de HAM pelas células de Sertoli [8]. Os resultados encontrados com bovinos, neste trabalho, endossam esse achado, uma vez que as concentrações séricas de T elevaram-se à medida que os animais atingiram a puberdade, enquanto as concentrações de HAM apresentaram um declínio acentuado aproximando-se do valor zero.

Durante o desenvolvimento puberal, em humanos, ocorre à maturação das células de Sertoli conjuntamente ao desenvolvimento da barreira hematotesticular, devido à formação das junções *gap* entre estas células. Neste momento as células de Sertoli assumem um padrão bidirecional de secreção e passam a secretar, principalmente, o HAM no espaço adluminal e em menor quantidade para o tecido intersticial. Assim, o HAM apresenta maior concentração no plasma seminal em relação à sanguínea [20,21,22]. Destarte, a concentração sérica de HAM declina, enquanto inicia-se uma elevação na concentração intratesticular de T, fato que ocorre antes da elevação deste hormônio no sangue [23]. Esta alta concentração de T intratesticular atua via receptores de andrógenos nas células de Sertoli em uma ação parácrina, sendo o mais potente inibidor de HAM. Logo, a queda nas concentrações séricas de HAM atua como um marcador da elevação da concentração de T intratesticular [20]. A redução na expressão de HAM pelas células de Sertoli foi relacionada diretamente com o início do aparecimento da espermatogênese [9].

Resultados anteriores mostraram que a concentração circulante de HAM é menor nos animais que atingiram a puberdade. Estes resultados sugerem que o HAM poderia ser um possível biomarcador com uma única amostra sanguínea, distinguindo, na desmama, os animais superprecoces dos tardios sendo, aproximadamente, cinco ng/mL o ponto de corte capaz de distinguir estas duas classes de precocidade sexual. Este achado proporciona além das vantagens econômicas ao proporcionar a diminuição da idade de entrada dos animais em reprodução, a aceleração do melhoramento genético do rebanho via principalmente à diminuição do intervalo entre gerações. Na distinção dos superprecoces e tardios, precoces e tardios, ainda há um confundimento na distinção destas classes sendo necessários mais estudos. Adicionalmente, na distinção da classe de puberdade, o perímetro escrotal se mostrou mais eficiente em diferenciar os animais púberes dos não púberes quando comparado ao HAM.

Os animais não púberes apresentaram menor média de ecogenicidade testicular quando comparado aos púberes. O aumento da ecogenicidade testicular, possivelmente, está relacionado à diferenciação das células de Sertoli, aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos, maior quantidade de células maduras na espermatogênese e formação da barreira hematotesticular [10,11,24]. Ademais, a ecogenicidade do parênquima testicular apresentou alta correlação positiva com o volume testicular e PE, o que está de acordo com os achados de Cardilli et al. [25]. Os resultados aqui encontrados mostram-se eficientes na distinção dos animais púberes e não púberes, mas, não revelaram correlação significativa entre a ecotextura testicular e a precocidade sexual, o que pode ser atribuído ao intervalo de tempo entre as coletas que, neste estudo, foi superior a um ciclo do epitélio seminífero de bovinos.

5. Conclusão

As concentrações séricas de HAM foram superiores às de T durante o período pré-púbere, enquanto na puberdade houve um decréscimo nas concentrações circulantes de HAM e às de T tornaram-se superiores neste momento. O HAM revelou-se como um possível biomarcador de precocidade sexual em *Bos indicus* (Nelore), com uma única coleta sanguínea, na desmana e concentração, aproximadamente, de cinco ng/mL, sendo possível distinguir os animais superprecoces dos tardios. A avaliação ultrassonográfica dos testículos se mostrou eficiente na distinção dos animais púberes dos não púberes, porém não se correlacionou com a precocidade sexual.

6. Agradecimentos

Ao grupo Genética Aditiva pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa de Mestrado.

7. Referências

- [1] Barth AD, Ominski KH. The relationship between scrotal circumference at weaning and at one year of age in beef bulls. *Can Vet J* 2000;4:541–6.
- [2] Siddiqui MAR, Bhattacharjee J, Das ZC, Islam MM, Islam MA, Haque MA, Parrish JJ, Shamsuddin M. Crossbred bull selection for bigger scrotum and shorter age at puberty with potentials for better quality semen. *Reprod Domest Anim* 2008;43:74–9.
- [3] Abdel-Razek AK, Ali, A. Developmental changes of Bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. *Reprod Domest Anim* 2005;40:23-7.
- [4] Behringer RR, Finegold MJ, CATE RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual. *Dev Cell* 1994;79:415–425.
- [5] Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 1996;10:2577–87.
- [6] Lane AH, Donahoe PK. New insights into Müllerian inhibiting substance and its mechanism of action. *J Endocrinol* 1998;158:1-6.
- [7] Giuli G, Shen WH, Ingraham HA. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development* 1997;124:1799-1807.

- [8] Rey RA, Lordereau-Richard L, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, et al. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1220-6.
- [9] Almeida J, Conley AJ, Mathewson L, Ball BA. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. *Theriogenology* 2012;77:847–857.
- [10] Chandolia RK, Honaramooz A, Omeke BC, Pierson R, Beard AP, Rawling N. Assessment of development of the testes and accessory gland by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology* 1997;48:119-132.
- [11] Aravindakshan JP, Honaramooz A, Bartlewski PM, Beard AP, Pierson RA, Rawliis NC. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology* 2000;54:339-354.
- [12] Moura JC, Merkt H. *A ultrassonografia na reprodução equina*. 2 ed, Salvador:Editora Universitária Americana;1996.
- [13] Fields MJ, Burn, WC, Warnick AC. Age, season and effects on testicular volume and semen traits in young bulls. *J Anim Sci* 1979; 48:1299-1304.
- [14] Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. *J Anim Sci* 1965;224:761-5.
- [15] Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, disponível em < <http://rsb.info.nih.gov/ij/>>, acessado em outubro de 2013.
- [16] Santos MD, Torres CAA, Ruas JRM, Machado GV, Costa DS, Angulo LM. Concentração sérica de testosterona em touros zebu. *R Bras Zootec* 2000;29:738-744.
- [18] Claes A, Ball BA, Almeida J, Corbin CJ, Conley AJ. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences

- between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology* 2013;79:1229–35.
- [19] Teixeira J, Fynn-Thompson E, Payne AH, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. *Endocrinology* 1999;140:4732-38.
- [20] Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:21-31.
- [21] Josso N, Picard JY, Dacheux JL, Courot M. Detection of anti-Müllerian activity in boar rete testis fluid. *J. Reprod Fertil* 1979;57:397–400.
- [22] Fujisawa M, Yamasaki T, Okada H, Kamidono S. The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Hum Reprod* 2002;17:968–970.
- [23] Pasqualini T, Chemes H, Rivarola MA. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. *Clin Endocrinol* 1981;15:545–554.
- [24] Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. *Theriogenology* 2012;78:69–76.
- [25] Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Oliveira JA, Mercadante MEZ. Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça Nelore criados em sistema extensivo. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2012;64:75-82.

Legenda das Figuras:

Figura 1. Concentração sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) expresso em ng/mL em bezerros Nelore classificados de acordo com a precocidade sexual em função do tempo. Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho (1), outubro (2) e janeiro (3), entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 2. Concentração sérica de testosterona, expressa em ng/mL, em bezerros Nelore classificados de acordo com a precocidade sexual em função do tempo.. Coletas sanguíneas realizadas nos meses julho (1), outubro (2) e janeiro (3), entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 3. Probabilidade estimada de puberdade, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL. Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 4. Probabilidade estimada de puberdade de acordo com o perímetro escrotal (PE), em centímetros. Coletas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 5. Probabilidade estimada de precocidade sexual, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL em análise de regressão logística pareada com os animais superprecoces (SP) e precoces (P). Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 6. Probabilidade estimada de precocidade sexual, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL em análise de regressão logística pareada com os animais superprecoces (SP) e tardios (Td). Coletas

sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 7. Probabilidade estimada de precocidade sexual, de acordo com as variações séricas de hormônio anti-Mülleriano (HAM), expresso em ng/mL em análise de regressão logística pareada com os animais precoces (P) e tardios (Td). Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho, outubro e janeiro, entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 8. Intensidade de pixel (Pixel) em bezerros Nelore classificados de acordo com a precocidade sexual em função do tempo. Coletas sanguíneas realizadas nos meses de julho (1), outubro (2) e janeiro (3), entre 10 e 16 meses de idade de machos bovinos Nelore.

Figura 1.

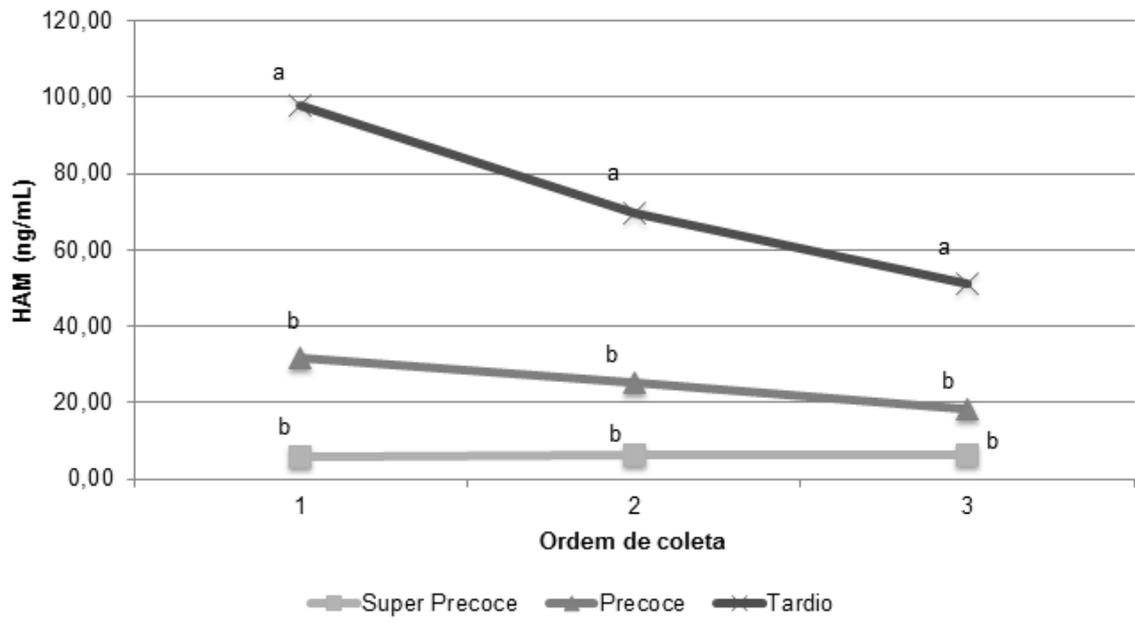


Figura 2.

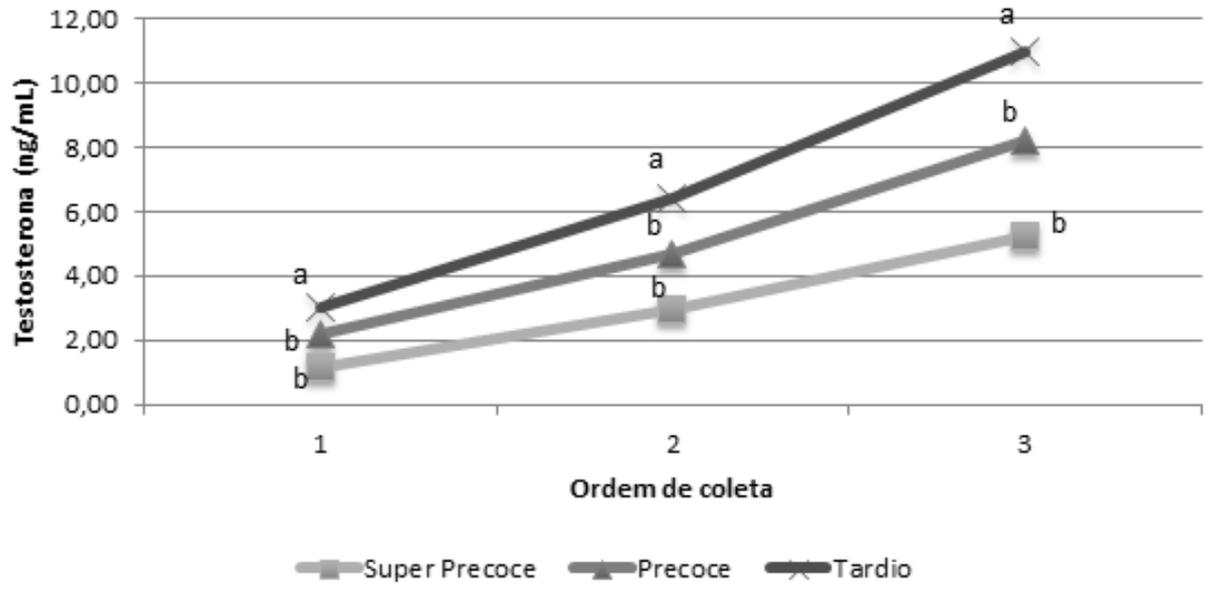


Figura 3.

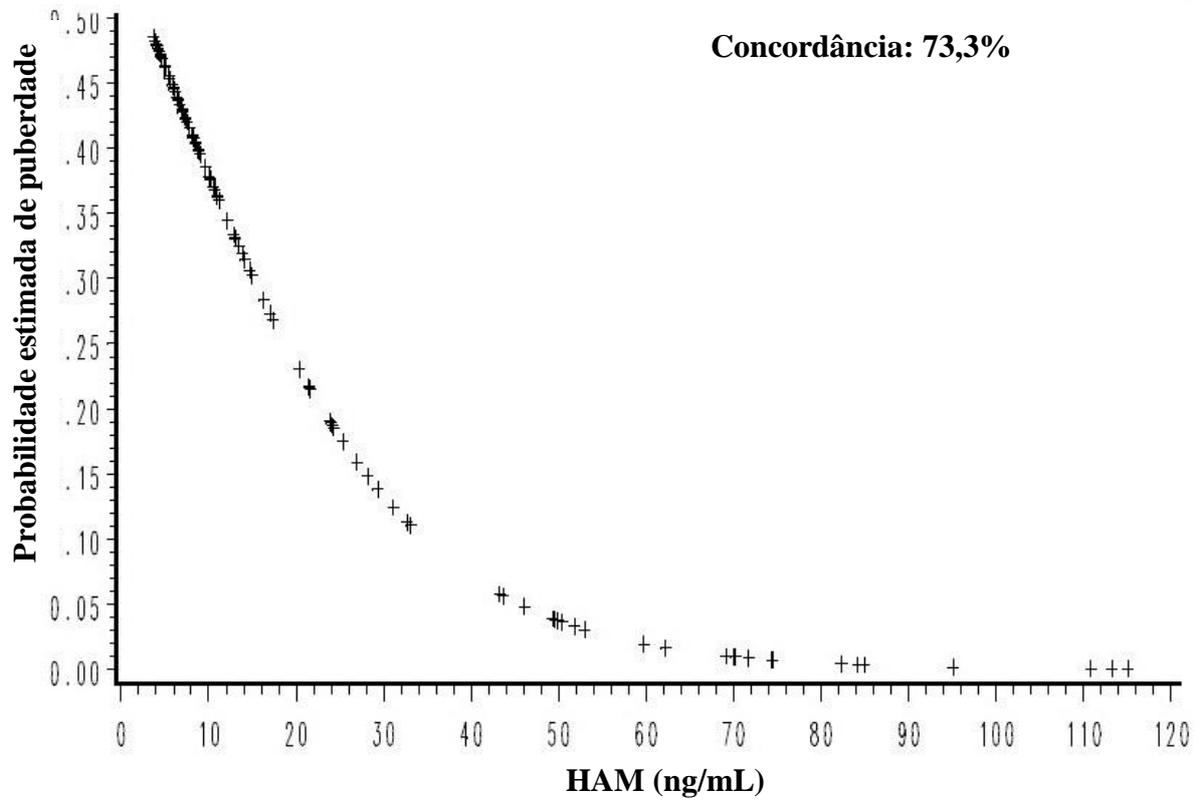


Figura 4.

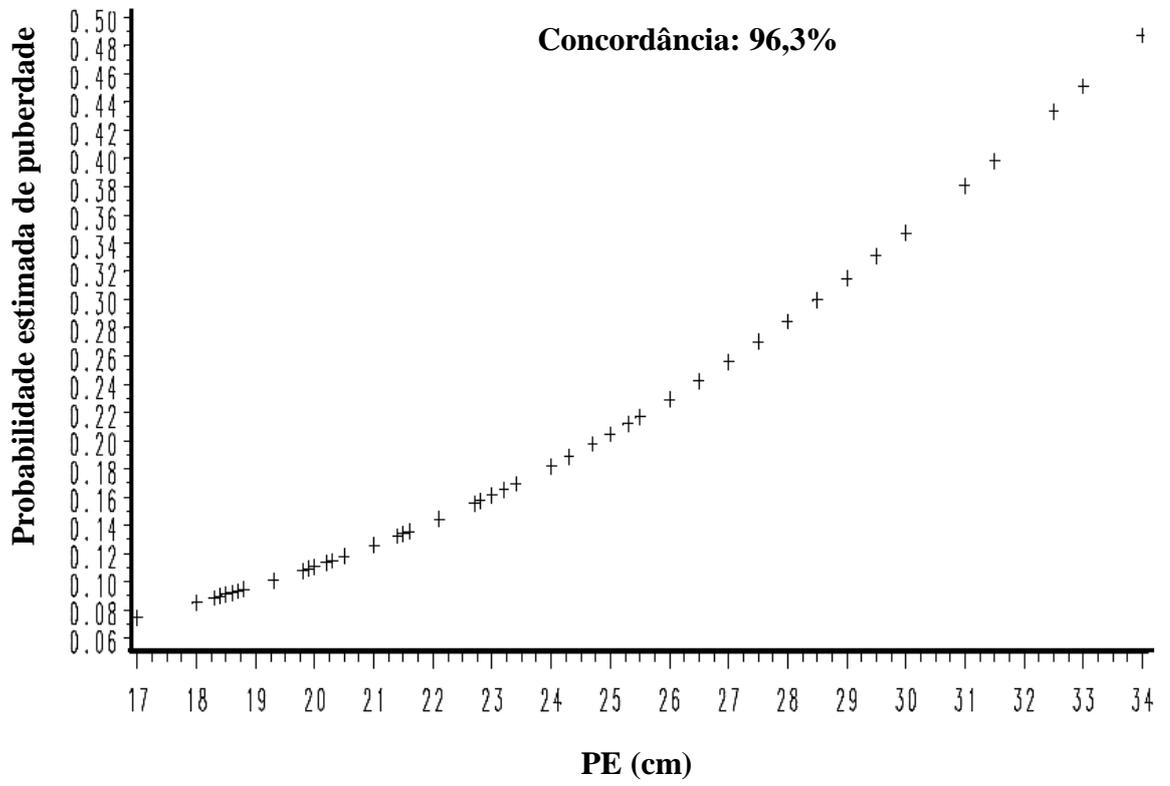


Figura 5.

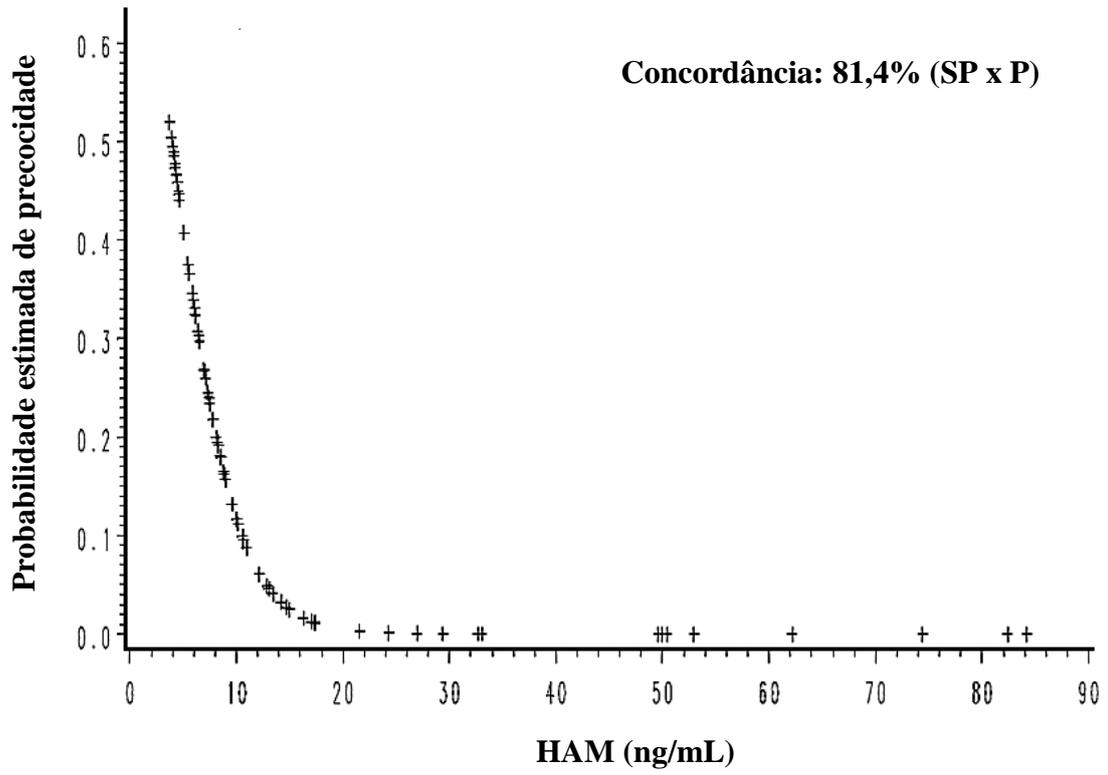


Figura 6.

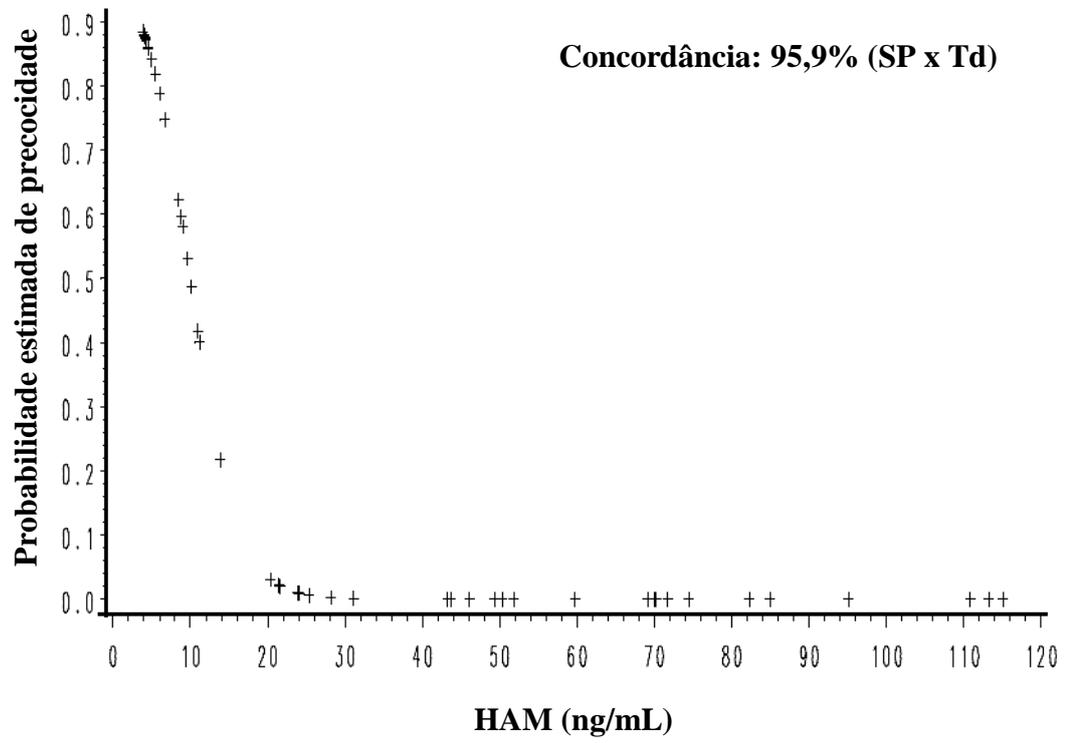


Figura 7.

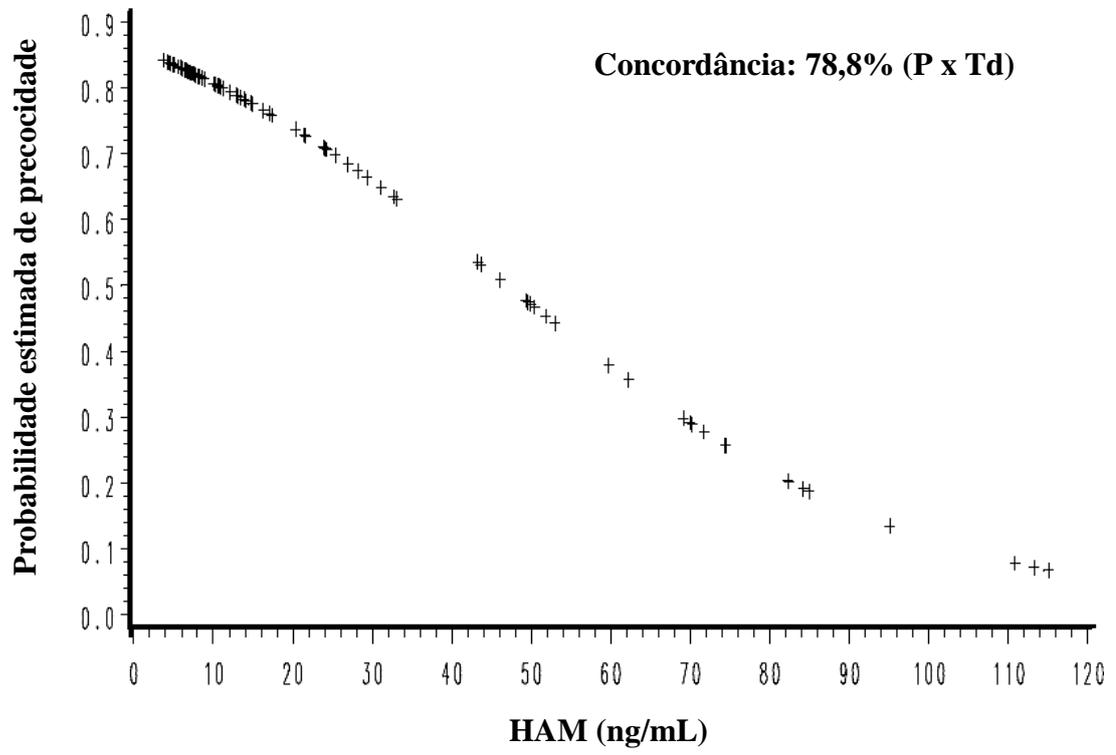


Figura 8.

