

TRÍCIA OSÓRIO DA SILVA

DESCENSO TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS SEMINAIS À
PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL EM CÃES DA RAÇA
RETRIEVER DO LABRADOR

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2003

TRÍCIA OSÓRIO DA SILVA

**DESCENSO TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS SEMINAIS À
PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL EM CÃES DA RAÇA
RETRIEVER DO LABRADOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 13 de agosto de 2003

Prof. José Domingos Guimarães
(Conselheiro)

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Conselheiro)

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula

Prof^{ra}. Simone Eliza Facione Guimarães

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

À minha avó Aurora, pelo exemplo de vida que deixou e pela certeza de que
continua a zelar por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em minha vida.

Aos meus pais Mariza e João Batista, pelos valores que me foram passados e por tornarem possível a realização dos meus sonhos.

Aos meus tios Sônia e José Carlos, os quais considero como meus segundos pais, pelo apoio, pela amizade e pelo acolhimento.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao meu orientador, Professor Eduardo Paulino da Costa, pelos ensinamentos e pela amizade nesses anos de convivência.

Ao meu conselheiro, José Domingos Guimarães, pelas sugestões e pelos esclarecimentos de dúvidas durante toda a realização do experimento.

Aos Professores Ciro, Simone e Tarcízio, pelas sugestões valiosas.

Aos meus estagiários Camilla, Dimitri, Érika e Rafael, pela ajuda indispensável à concretização deste trabalho.

Ao meu primo-padrinho Carlos Henrique, pela amizade e pelo auxílio na parte estatística.

Ao meu amor Renato, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos proprietários dos cães utilizados no experimento Bruna, Ana Lúcia e Sérgio, Renata, Renato, Paulo Ricardo, Gilberto, Nilson e Juninho, por terem cedido seus animais.

Aos meus irmãos, tios e primos, pelas diversas formas de auxílio a mim concedidas.

À Rosinéia Aparecida da Cunha Andrade, secretária de pós-graduação do Departamento de Veterinária, pela boa vontade e disponibilidade em ajudar.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, especialmente a Wald`ma e Letícia, pela convivência e pelo apoio.

A todos os meus amigos, pela amizade e por se fazerem sempre presentes de alguma forma.

Aos meus filhotes Chuca e Godan, pelo amor incondicional e por toda a alegria que me proporcionam com suas demonstrações de carinho.

Aos cães do experimento desta dissertação, por terem alegrado meus dias de trabalho com suas brincadeiras, latidos e lambidas.

BIOGRAFIA

TRÍCIA OSÓRIO DA SILVA, filha de João Batista da Silva e Mariza Aurora Osório da Silva, nasceu em 20 de outubro de 1976, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2001, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Em agosto de 2001, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Medicina Veterinária da UFV, na área de concentração em Reprodução e Produção Animal, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2003.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos morfológicos do descenso testicular	3
2.1.1. O gubernáculo.....	3
2.1.2. Ligamento suspensório cranial	5
2.1.3. Pressão abdominal	6
2.2. Controle hormonal e aspectos fisiológicos da descida testicular ..	6
2.3. O descenso testicular no cão.....	9
2.4. Puberdade e maturidade sexual	10
2.4.1. Alterações histológicas dos órgãos reprodutivos durante a puberdade e a maturidade sexual.....	12
2.4.2. Hormônios durante a puberdade e a maturidade sexual	13

	Página
2.4.3. Qualidade seminal durante a puberdade e a maturidade sexual	16
2.4.4. Relação peso corporal e puberdade	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Relação dos animais utilizados (X) nas avaliações do descenso testicular, da puberdade e da maturidade sexual	22
2. Idade média ou intervalos de idades médias (semanas) em que os testículos de nove cães da raça Retriever do Labrador foram palpáveis no colo do escroto, próximo ao escroto e no escroto	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquema dos critérios adotados para a verificação da posição do testículo (1) na região do escroto (2). A letra A representa o critério testículo palpável no colo do escroto; a letra B , palpável próximo ao escroto; e a letra C , palpável no escroto.....	21
2. Material utilizado para coleta de sêmen: funil plástico acoplado a um tubo de centrífuga de vidro graduado, ambos acondicionados dentro de um recipiente de isopor contendo água a 37 °C	22
3. Cão pré-púbere Retriever do Labrador (26 semanas de idade) apresentando ereção peniana completa	31
4. Cão pré-púbere Retriever do Labrador (26 semanas de idade) com movimentos pélvicos intensos simulando coito	32
5. Gráfico das mudanças na porcentagem média de motilidade espermática progressiva retilínea (—■—), porcentagem média de defeitos maiores (—▲—) e porcentagem média de defeitos totais (—□—), no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual.....	34

6. Gráfico das mudanças nos valores médios do vigor espermático (—▲—) e turbilhonamento (—○—) – movimento de massa dos espermatozóides em forma de ondas –, no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual 36
7. Gráfico das mudanças nos valores médios da concentração espermática por mililitros (—▲—), no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual 37
8. Gráfico das mudanças nos valores médios do número total de espermatozóides no ejaculado (—◆—), no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual 37

RESUMO

OSÓRIO DA SILVA, Trícia , M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Descenso testicular e características seminais à puberdade e maturidade sexual em cães da raça Retriever do Labrador.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Conselheiros: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

No presente trabalho foram verificados o descenso testicular em cães da raça Retriever do Labrador e a idade na qual esses cães atingem a puberdade e a maturidade sexual. Os testículos não foram palpáveis na região inguinal no segundo dia após o nascimento. Na décima semana de idade, eles o foram no colo do escroto ($10 \pm 0,44$), permanecendo palpáveis nessa região até a décima segunda semana ($12 \pm 0,78$). Esses órgãos foram palpáveis próximos ao escroto na décima terceira semana de idade ($13 \pm 0,78$) até a décima quinta ($15 \pm 0,78$). Sua palpação no escroto ocorreu na décima sexta semana de idade ($16 \pm 0,78$). A puberdade foi considerada como o aparecimento dos primeiros espermatozoides no ejaculado, e isso aconteceu na idade de 29 semanas ($29 \pm 0,54$). No decorrer do período pós-puberal houve decréscimo na porcentagem de defeitos maiores e defeitos totais, bem como aumento na motilidade progressiva, no turbilhonamento, no vigor espermático, na concentração espermática por mL e no número total de espermatozoides no ejaculado. As anormalidades mais

encontradas logo após a puberdade foram: patologias de acrossoma e formas teratológicas. Entre as anormalidades consideradas defeitos menores, a que mais se observou nesse período foi a gota citoplasmática distal. Os cães atingiram a maturidade sexual na idade de 43 semanas ($43 \pm 1,12$).

ABSTRACT

OSÓRIO DA SILVA, Trícia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2003. **Testicular descent and seminal characteristics at puberty and sexual maturity in Labrador Retriever dogs.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Committee members: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective of this work was to study testicular descent in Labrador Retriever dogs and also the age of these dogs at puberty and sexual maturity. The testicles were not detectable at the inguinal area at two days after birth, but on the tenth week (10 ± 0.44) after birth they were palpable in the neck region of the scrotum and remained so detected to the twelfth week (12 ± 0.78). The testicles were detected proximal to the scrotum from the thirteenth week (13 ± 0.78) to the fifteenth week (15 ± 0.78). The testicles became palpable in the scrotum at the sixteenth week (16 ± 0.78). The considered puberty began when the first spermatozoa appeared in the ejaculate and it happened at the age of twenty nine weeks (29 ± 0.54). By the regression analysis, in the post pubertal phase, the ejaculate showed a decrease in the percentage of major and of total defects, and on the other hand an increase of the progressive motility, spermatozoa waves movements, sperm vigor, spermatozoa concentration and total number of spermatozoa. At the age of forty three weeks (43 ± 1.12) the dogs achieved sexual maturity.

1. INTRODUÇÃO

A descida dos testículos é necessária na maioria dos mamíferos homeotérmicos para que ocorra fertilidade normal após a puberdade. A produção espermática requer que os testículos estejam presentes no escroto e, dessa forma, numa temperatura mais baixa que a corporal. O tempo do descenso testicular é variável entre as espécies, sendo mais prolongado na canina (GIER e MARRION, 1969).

Existem poucos trabalhos abordando a idade da descida dos testículos em cães, e somente alguns relatam a questão da idade e posição em que os testículos podem ser palpados externamente. No entanto, a palpação e a inspeção visual são os procedimentos utilizados na rotina dos consultórios veterinários para diagnosticar criptorquidismo. Além disso, há muitas divergências na literatura sobre o tempo normal do descenso testicular no cão. Mas a maioria dos autores concorda que os cães não nascem com os testículos no escroto (GIER e MARION, 1969; BAUMANS et al., 1981; KAWAKAMI et al., 1993; RAVASZOVÁ et al., 1995).

Diferenças raciais em relação ao tempo de descida dos testículos na espécie canina não têm sido muito observadas na literatura. Entretanto, a espécie apresenta uma diversidade muito grande de raças, e em algumas delas o descenso testicular ocorre em idade diferente da comumente observada. Essas diferenças

são extremamente importantes na rotina veterinária, pois, se não consideradas, podem levar a diagnósticos errôneos de criptorquidismo.

De modo geral, a descida dos testículos acontece numa fase do desenvolvimento canino denominada infância. Logo após esse estágio, há dois períodos de transição entre a infância e o período adulto denominados puberdade e período pós-puberal. A produção espermática nesses períodos é deficiente, gerando dúvidas tanto no proprietário quanto no médico veterinário, sobre quando um cão pode ser utilizado como reprodutor.

No período pós-puberal há um aumento gradativo na qualidade do sêmen, de modo que, na maturidade sexual, o padrão seminal atinge os valores normais para um animal adulto. Tem sido relatada uma variação racial quanto à idade em que os animais alcançam tanto a maturidade quanto a puberdade, apesar de poucas raças caninas terem sido abordadas na literatura. Assim, há necessidades de pesquisas envolvendo diferentes raças, pois, além do interesse dos proprietários, há o dos donos de canis, que querem utilizar os seus cães como reprodutores tão logo estejam aptos para tal.

Diferente, entretanto, dos trabalhos que abordam a qualidade seminal na espécie bovina durante a maturidade sexual e, ou, puberdade, os trabalhos realizados com cães tratam muito pouco das mudanças nos padrões seminais, principalmente com relação à morfologia espermática nesses períodos. Dessa forma, estudos abordando as principais patologias encontradas durante os estágios de desenvolvimento que antecedem a maturidade sexual são necessários na espécie canina, pois facilitam o reconhecimento desses estágios durante a avaliação seminal de um animal jovem.

O objetivo deste trabalho foi verificar a idade em que os testículos de cães da raça Retriever do Labrador são palpáveis no escroto, bem como aquela na qual esses cães atingem a puberdade e a maturidade sexual.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos morfológicos do descenso testicular

2.1.1. O gubernáculo

O gubernáculo é uma estrutura mesenquimal que, antes do início da descida testicular, está localizada no abdômen, em uma prega do peritônio que se estende dos testículos para a região inguinal, havendo uma pequena extensão extra-abdominal. O peritônio invade a porção extra-abdominal do gubernáculo na região do futuro anel inguinal profundo, e esta invaginação, que pode ser considerada o início do processo vaginal, divide o gubernáculo em três partes: (a) *Pars proprium*, constituída pelas porções intra e extra-abdominal suspensas pela camada de peritônio visceral do processo vaginal; (b) *Pars vaginalis*, formada pela porção extra-abdominal rodeando externamente a camada parietal do processo vaginal; e (c) *Pars infravaginalis*, extremidade caudal do gubernáculo que não é invadida pelo processo vaginal (WENSING, 1988).

Durante a migração testicular, a proporção das partes intra e extra-abdominal do gubernáculo é alterada e, à medida que os testículos se aproximam do anel inguinal profundo, a parte extra-abdominal aumenta progressivamente sua participação nessa proporção. Ao mesmo tempo, há um aumento de volume,

principalmente da parte extra-abdominal, que dilata o anel inguinal profundo e exerce uma tração sobre a porção intra-abdominal do gubernáculo próprio, movendo gradualmente essa parte junto com os testículos e epidídimos por meio do anel inguinal profundo. Além disso, a contração dos músculos abdominais pode causar aumento temporário da pressão intra-abdominal (WENSING, 1986; OPRINS et al., 1988; WENSING, 1988).

Nas espécies suína e canina e nos ungulados, cujo músculo cremaster na anatomia adulta assume a forma de uma faixa, o processo de descida dos testículos é semelhante. A principal reação gubernacular nos suínos e ungulados é a de crescimento extra-abdominal (WENSING, 1986; WENSING, 1988). A espécie canina, no entanto, apesar de também apresentar evidente crescimento da parte extra-abdominal do gubernáculo, contém um diferencial: a maior parte do processo de descenso testicular ocorre durante a fase de regressão do gubernáculo (BAUMANS et al., 1981; WENSING, 1988). Na espécie humana, o crescimento gubernacular e a migração extra-abdominal dos testículos são mais ou menos semelhantes à situação nessas espécies (HEYNS e De KLERK, 1985).

Ao contrário das referidas espécies, o processo de descida testicular nos roedores é morfologicamente diferente. Isso porque o músculo cremaster de roedores possui uma forma bilaminar de saco e tem papel ativo na fase de crescimento gubernacular (WENSING, 1986).

Nas espécies domésticas e no homem, o crescimento gubernacular é causado pela ativa divisão celular e pelo aumento de volume da substância extracelular. Esse aumento é caracterizado principalmente pela maior quantidade de ácido hialurônico (WENSING, 1988; HEYNS et al., 1990). O conteúdo de glicosamina também aumenta durante essa fase, assim como, conseqüentemente, a absorção de água (BAUMANS et al., 1981; WENSING, 1988; HEYNS et al., 1990).

Logo após a fase de crescimento do gubernáculo, inicia-se a fase de regressão, durante a qual a maior parte da matriz extracelular desaparece e o gubernáculo se torna gradualmente opaco e fibroso (BAUMANS et al., 1981; HEYNS e De KLERK, 1985; HUTSON et al., 1997).

Há diferenças entre espécies quanto ao início da fase de regressão. Na espécie suína, esse início torna-se óbvio quando os testículos alcançam o canal inguinal, por volta de 110 a 120 dias pós-coito (Wensing, 1968, citado por WENSING, 1988). Já no cão os sinais de regressão já são notados quando os testículos ainda estão numa posição intra-abdominal, por volta do quinto dia após o nascimento (BAUMANS et al., 1981).

Durante a fase de regressão, os testículos atravessam a área ocupada anteriormente pela *pars proprium* do gubernáculo e alcançam sua posição final no escroto. A invasão do processo vaginal para dentro do gubernáculo fixa uma extensão da cavidade peritoneal, mantendo os testículos e os epidídimos como órgãos peritoneais (WENSING, 1986; WENSING, 1988).

No final da fase de regressão, a *pars proprium* e a *pars infravaginalis* do gubernáculo são convertidas em ligamento próprio do testículo e ligamento da cauda do epidídimo (ELLENPORT, 1986; WENSING, 1986).

2.1.2. Ligamento suspensório cranial

O ligamento suspensório cranial (LSC) é localizado entre a parede abdominal dorsal e a extremidade cranial das gônadas (van der SCHOOT e EMMEN, 1996). Esse sofre regressão em fetos machos para que a descida dos testículos ocorra normalmente (van der SCHOOT, 1993).

Segundo van der SCHOOT e EMMEN (1996), o LSC pode ter importante papel na fisiopatologia da descida testicular na maioria das espécies animais e, no entanto, tem recebido pouca atenção dos pesquisadores. Corroborando esses autores, KERSTEN et al. (1996) relataram o caso de um cão com criptorquidismo bilateral e persistência de espessos ligamentos suspensórios craniais. Adicionalmente, algumas pesquisas com ratos têm demonstrado que a deficiência de andrógenos na fase fetal leva à persistência do LSC e, conseqüentemente, falha na descida dos testículos (van der SCHOOT e ELGER, 1992; SPENCER BARTHOLD et al., 1994; SHONO et al., 1995).

2.1.3. Pressão abdominal

A passagem dos testículos pelo canal inguinal é resultado do aumento da pressão intra-abdominal, além de ser facilitada pela dilatação do canal causada pelo gubernáculo (Backhouse e Butler, 1960, citados por BAUMANS et al., 1981; FREY e RAJFER, 1984; HEYNS e HUTSON, 1995).

O aumento da pressão intra-abdominal tem sido correlacionado por alguns autores com o desenvolvimento dos órgãos internos de fetos (GIER e MARRION, 1969; ELDER et al., 1982). Além disso, KAWAKAMI et al. (1993) observaram que a passagem dos testículos de cães pelo canal vaginal é acelerada em associação com o aumento do peso corporal depois do nascimento.

2.2. Controle hormonal e aspectos fisiológicos da descida testicular

Na maioria dos mamíferos, incluindo o cão, os testículos estão localizados inicialmente no pólo caudal dos rins. Durante a primeira fase da descida testicular, há o crescimento do gubernáculo através do canal inguinal em direção ao escroto, e simultaneamente os testículos são conduzidos para esse canal. Na segunda fase, os testículos passam pelo canal inguinal e descem para a posição escrotal, ao mesmo tempo que o gubernáculo sofre a reação de regressão (Wensing, 1986, citado por FENTENER van VLISSINGEN et al., 1988; BAUMANS et al., 1985).

Os fatores responsáveis pelo controle do crescimento e da regressão do gubernáculo não foram ainda totalmente esclarecidos, havendo conflitos na literatura quanto à ação dos hormônios (COLENBRANDER et al., 1978; BAUMANS et al., 1981; BAUMANS et al., 1985; Hutson, 1985, citado por WENSING, 1988; FENTENER van VLISSINGEN et al., 1988; OPRINS et al., 1988; KAWAKAMI et al., 1993; SHONO et al., 1994; VISSER e HEYNS, 1996; EMMEN et al., 2000).

A dependência de andrógenos do gubernáculo na fase de crescimento foi relatada por alguns autores (ELDER et al., 1982; SPENCER et al., 1991). Corroborando esses autores, EMMEN et al. (2000) observaram que a reação de

crescimento do gubernáculo *in vitro* é dependente de andrógenos. SPENCER et al. (1991) e CAIN et al. (1995) relataram redução no desenvolvimento da parte mesenquimal do gubernáculo de fetos de ratos expostos a antiandrógenos.

A maioria dos autores, entretanto, acredita que os andrógenos atuam mais efetivamente na fase de regressão do gubernáculo (COLENBRANDER et al., 1978; BAUMANS et al., 1983; BAUMANS et al., 1985; HEYNS e HUTSON, 1995). Assim, a testosterona induz a regressão do gubernáculo em cães, além de, possivelmente, desempenhar alguma função na fase de crescimento do gubernáculo, apesar de não haver mudanças marcantes na concentração plasmática nessa fase (BAUMANS et al., 1983). Além disso, segundo GROCOCK et al. (1988), a migração do gubernáculo de camundongos para além da região inguinal não ocorre em animais com deficiência de gonadotropinas, o que evidencia o possível papel dos andrógenos na fase de regressão do gubernáculo.

Alguns estudos realizados com fetos de cães e cultura de células do gubernáculo de suínos têm indicado que o crescimento deste pode ser estimulado por um fator desconhecido, produzido pelos testículos durante a primeira fase da descida testicular (BAUMANS et al., 1983; FENTENER van VLISSINGEN et al., 1988; VISSER e HEYNS, 1995). Esse fator possui baixo peso molecular e difere dos de crescimento – fator de crescimento epidermal, insulina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento do fibroblasto, fator transformador de crescimento (TGF- β) – e dos hormônios testiculares fetais (FENTENER van VLISSINGEN et al., 1988). Estes autores sugeriram o nome de “descendin” para esse fator. Outros autores relataram que o nome dessa substância por sua atividade hormonal deveria ser, na linha dos hormônios trópicos, a exemplo das gonadotropinas, “gubernaculotropina” (VISSER e HEYNS, 1995).

Outras substâncias, como hormônio anti-Mulleriano (MIH), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e hormônio semelhante à insulina produzido pelas células de Leydig (Insl3), têm sido relacionadas com as reações

de crescimento e, ou, regressão do gubernáculo (HUTSON et al., 1990; BEHRINGER et al., 1994; EMMEN et al., 2000).

O MIH é uma glicoproteína produzida pelas células de Sertoli responsável pela regressão embrionária dos ductos paramesonéfricos (JOSSO et al., 1993). Algumas observações em camundongos e humanos com retenção dos ductos paramesonéfricos e ausência de descida testicular evidenciaram que esse hormônio tenha algum papel na fase de crescimento do gubernáculo (HUTSON et al., 1990; ABE e HUTSON, 1994). Porém, MIH bovino semipurificado não causou divisão celular na cultura de células do gubernáculo de suínos, contestando, assim, o suposto papel do MIH no descenso testicular (FENTENER van VLISSINGEN et al., 1988).

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo que foi estudado quanto à sua ação no gubernáculo de roedores (PARK e HUTSON, 1991; MOMOSE et al., 1992). Por enquanto, o CGRP é descrito como um transmissor neuromuscular que pode não ter um papel muito relevante no processo de descida testicular nas espécies que possuem o músculo cremaster na forma de uma faixa (HUSMANN e LEVY, 1995). No entanto, em um trabalho mais recente com suínos neonatos demonstrou-se que CGRP exógeno estimulou a migração de testículos inguinais, indicando que o CGRP possa também ter um papel no descenso testicular nas espécies com um pequeno músculo cremaster (HUTSON et al., 1998).

O hormônio semelhante à insulina produzido pelas células de Leydig (Insl3) é um membro da família dos hormônios insulina. Esse hormônio é expresso nas células de Leydig de testículos pré- e pós-natal e nas células da teca de ovários pós-natal (Zimmermann et al., 1997, citados por EMMEN et al., 2000). Estes autores verificaram que gônadas de camundongos mutantes $Insl3^{-/-}$ não induziram proliferação celular em cultura de células do gubernáculo de ratos, relatando que o Insl3 exerce um papel no desenvolvimento do gubernáculo. É necessária a realização de mais estudos para confirmar a função do Insl3 no processo de descida dos testículos.

2.3. O descenso testicular no cão

BAUMANS et al. (1981), examinando 87 filhotes de três raças diferentes, sendo 14 deles sem raça definida, observaram que os testículos dos cães estavam localizados perto do pólo caudal dos rins 53 dias após o coito. Ao nascimento, estão no meio do caminho entre os rins e o anel inguinal profundo; no quinto dia após o nascimento, os testículos já passaram o canal inguinal; 15 a 17 dias após o nascimento estão no meio do caminho entre o anel inguinal superficial e o escroto; e entre o trigésimo quinto e o quadragésimo dia após o nascimento é que alcançam sua posição final no escroto.

Ainda de acordo com BAUMANS et al. (1981), o testículo esquerdo precede o direito na descida até o décimo quinto dia após o nascimento. Aproximadamente a partir do décimo quarto dia após o parto, os testículos são palpáveis, no entanto a palpação é difícil nessa fase. Mais tarde, quando os testículos se encontram na região do colo do escroto, a palpação é facilitada. Entre 20 e 25 dias após o parto os testículos são palpáveis numa posição próxima ao escroto. No quinto dia após o nascimento há um depósito de gordura subcutânea no escroto que desaparece no vigésimo quinto dia após o parto. No entanto, há divergências na literatura quanto ao tempo normal da descida testicular canina. Segundo Nickel et al. (1982), citados por RAVASZOVÁ et al. (1995), os testículos logo após o nascimento estão localizados no seu local de origem, na região lombar. Entretanto, BAUMANS et al. (1981) verificaram que eles estão localizados no meio do caminho entre os rins e os anel inguinal profundo ao nascimento. Já GIER e MARION (1969) encontraram os testículos perto do anel inguinal, e RHOADES e FOALEY (1977) observaram-nos no escroto ao nascimento.

GIER e MARION (1969) relataram que a descida dos testículos ocorre no décimo dia após o nascimento. BAUMANS et al. (1981) e KAWAKAMI et al. (1993) observaram que os testículos alcançam a posição final no escroto por volta de 35 dias após o parto. Há relatos na literatura de que a descida testicular em cães da raça Shetland Sheepdog freqüentemente se prolonga até dois anos de

idade sem, no entanto, afetar a fertilidade (Riemann, 1978; Streun, 1978, citados por RAVASZOVÁ et al., 1995). RAVASZOVÁ et al. (1995) estudaram apenas um animal dessa raça, verificando que o descenso testicular se completou aos seis meses de idade.

RAVASZOVÁ et al. (1995) estudaram o descenso testicular em 101 cães de várias raças, concluindo que em 90% dos casos os testículos passaram pelo canal inguinal por volta de 36 a 37 dias após o nascimento e, em 97% dos casos, alcançaram a posição escrotal antes dos 42 dias após o nascimento.

2.4. Puberdade e maturidade sexual

Segundo MIALOT et al. (1988), o cão apresenta três estágios de desenvolvimento que precedem a maturidade sexual. São eles: a infância, a puberdade e o período pós-puberal.

A puberdade é o estágio de transição entre a infância e a maturidade, caracterizado por progressivas mudanças endócrinas, as quais são essenciais para a espermatogênese (MIALOT et al., 1985).

A idade na qual a puberdade é alcançada é influenciada pela genética, pela nutrição e pelos fatores ambientais. Além disso, a puberdade varia entre espécies e entre raças dentro da mesma espécie (SKINNER e ROWSON, 1968; HAFEZ, 1995; SCHMIDT-HEBBEL et al., 2000; JOHNSTON et al., 2001).

Em bovinos, a puberdade é definida como a idade na qual o primeiro ejaculado contendo 50 milhões de espermatozoides no volume total, com no mínimo 10% de motilidade progressiva, é obtido (WOLF et al., 1965). Em cães, no entanto, a puberdade é freqüentemente definida como a idade na qual os primeiros espermatozoides aparecem no ejaculado (TAHA et al., 1981; MIALOT et al., 1985; KAWAKAMI et al., 1995). JOHNSTON et al. (2001) relataram que, além do aparecimento dos primeiros espermatozoides no ejaculado, a puberdade canina é caracterizada ainda pela manifestação de desejo e habilidade de copular.

KUMI-DIAKA e ADEYANJU (1986) definiram a puberdade em cães, abordando aspectos histológicos dos testículos, como a idade na qual a espermatogênese foi observada em pelo menos 40% dos túbulos seminíferos.

Logo após a puberdade, no período pós-puberal há uma melhoria progressiva da espermatogênese que atinge o ápice na maturidade sexual (TAHA et al., 1981; MIALOT et al., 1985). A maturidade sexual em mamíferos envolve uma série de eventos fisiológicos complexos (Ojeda e Urbanski, 1988, citados por INABA et al., 1994). Entretanto, pode ser definida como a idade na qual o ejaculado atinge os padrões seminais considerados normais para um adulto da espécie (TAHA et al., 1981; EVANS et al., 1995; KAWAKAMI et al., 1995).

Segundo KUMI-DIAKA e ADEYANJU (1986), maturidade sexual é definida, de forma histológica, como a idade na qual grandes reservas espermáticas gonadais e epididimárias se tornam aparentes, com pelo menos 60% da cauda do epidídimo contendo espermatozóides. Esses pesquisadores verificaram que uma raça canina nigeriana atingiu a puberdade aos sete a oito meses e a maturidade sexual, aos 10 a 11 meses de idade. MIALOT et al. (1985) observaram o primeiro espermatozóide no ejaculado de cães Fox Terrier na idade de 32 a 34 semanas; com 45 semanas de idade, esses animais ainda não haviam atingido a maturidade sexual. Cães da raça Collie alcançam a puberdade aos 12 meses de idade (Ford, 1969, citado por TAHA et al., 1981). Enquanto KAWAKAMI et al. (1995) encontraram os primeiros espermatozóides nos testículos de Beagle com 27 a 29 semanas de idade, TAHA et al. (1981) verificaram os primeiros espermatozóides no ejaculado de cães dessa raça com 33 a 34 semanas de idade. Esses últimos autores observaram que os referidos animais atingiram a maturidade sexual com 45 semanas de idade.

De forma geral, cães machos alcançam a puberdade com seis a 12 meses de idade, ressaltando-se que raças menores atingem tanto a puberdade quanto a maturidade sexual mais precocemente que as maiores (JONHSTON et al., 2001).

2.4.1. Alterações histológicas dos órgãos reprodutivos durante a puberdade e a maturidade sexual

Mudanças histológicas marcantes foram observadas nos testículos de cães Beagle com 28 semanas de idade. O diâmetro dos túbulos seminíferos aumentou, e foram observados os primeiros espermatozóides nesses túbulos. Um aumento acentuado no diâmetro dos ductos da cauda do epidídimo, além de elevação na altura do epitélio e dos estereocílios da cabeça do epidídimo, foi notado nessa idade. Um pequeno número de espermatozóides foi encontrado no corpo e cauda do epidídimo (KAWAKAMI et al., 1991).

KUMI-DIAKA e ADEYANJU (1986) também relataram um aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos de uma raça canina nigeriana, ao mesmo tempo que a espermatogênese foi observada em 40% dos túbulos, na idade média de 7,8 meses.

O número de células de Leydig aumentou depois de 28 semanas de idade, e cães da raça Beagle com 32 semanas de idade apresentaram os testículos com ativa espermatogênese. Numerosos espermatozóides também foram vistos no ducto do corpo e cauda do epidídimo desses cães depois de 32 semanas de idade (KAWAKAMI et al., 1991).

Foi demonstrada, por observações histológicas, uma função secretória do epitélio dos ductos dos epidídimos de cães depois de 20 semanas de idade, pela presença de secreção PAS-positiva no lúmen do ducto da cauda do epidídimo (KAWAKAMI et al., 1991). Essas glicoproteínas PAS-positivas do epidídimo têm sido relacionadas com fertilidade espermática (MOORE, 1980).

A próstata de cães Beagle apresentou um acentuado desenvolvimento em cães com 32 semanas de idade. Nessa idade, o epitélio glandular desse órgão foi encontrado projetado para o lúmen, e o diâmetro dos alvéolos glandular aumentou. Secreção PAS-positiva foi encontrada acumulada no lúmen glandular (KAWAKAMI et al., 1991).

2.4.2. Hormônios durante a puberdade e a maturidade sexual

O primeiro evento endócrino da puberdade parece ser um aumento na amplitude e, ou, frequência dos pulsos de gonadotropinas, devido a um aumento na liberação pulsátil do hormônio hipotalâmico de liberação das gonadotropinas (GnRH) (STYNE, 1994; ROGOL, 2002). A etiologia da liberação pulsátil de GnRH não foi ainda estabelecida, e, dessa forma, os fatores específicos que controlam o início das mudanças endócrinas que ocorrem durante a puberdade ainda precisam ser elucidados. No entanto, o controle fisiológico da liberação de gonadotropinas é realizado basicamente de dois modos. Os primeiros mecanismos são o “feedback” negativo dos esteróides sexuais e a ação da inibina (um hormônio secretado pelas células de Sertoli, cujo papel primário é suprimir a liberação do hormônio folículo-estimulante – FSH). O segundo, que foi demonstrado em humanos durante a chamada pausa juvenil na qual a atividade gonadal é reduzida, é o controle pelo sistema nervoso central. A forma como este mecanismo de inibição das gonadotropinas pelo sistema nervoso central funciona é desconhecida (STYNE, 1994).

Há evidências de que tanto nos animais quanto no homem é necessária a presença do hormônio folículo-estimulante (FSH) e da testosterona para o alcance da espermatogênese normal. Existem, no entanto, diferenças entre as espécies quanto ao papel relativo de cada hormônio na espermatogênese (McLACHLAN, 2000).

De modo geral, o FSH age via receptores específicos nas células de Sertoli do epitélio seminífero e tem um papel-chave no desenvolvimento dos testículos imaturos (Orth, 1993, citado por McLACHLAN, 2000). O papel do FSH na puberdade parece estar relacionado com a maturação das células de Sertoli (McLACHLAN, 2000), regulação da transcrição de receptores para andrógenos nessas células (HIORT, 2002) e regulação da síntese de proteínas ligantes de andrógenos (FELDMAN e NELSON, 1996).

O outro hormônio gonadotrópico, o hormônio luteinizante (LH), também é necessário ao desenvolvimento e manutenção das funções testiculares (HIORT,

2002). Até a puberdade, as células de Leydig são quiescentes, e com o aumento na secreção de LH durante a puberdade há uma elevação na secreção de testosterona via atuação do LH em receptores nessas células (McLACHLAN, 2000). O LH pode também regular o tamanho da população das células de Leydig, pelo controle da proliferação e diferenciação destas (CHEMES et al., 1985; NALBET et al., 1998).

Assim, a puberdade é associada ao aumento na produção de andrógenos. O principal andrógeno responsável pelo desenvolvimento masculino durante a puberdade é a testosterona. Esta é convertida nos tecidos-alvo em 5α -diidrotestosterona pela ação da enzima 5α -redutase (HIORT, 2002). As ações da testosterona durante a puberdade e maturidade sexual incluem estimulação da libido, aumento do tamanho dos testículos e do pênis e indução e manutenção da espermatogênese (HIORT, 2002).

Associada com o aumento da testosterona plasmática em humanos, uma descarga de hormônio do crescimento (GH) precede o início da puberdade (ROGOL, 2002). Em bovinos, a concentração plasmática do fator de crescimento tipo I semelhante à insulina (IGF-I), que é o principal mediador da ação do GH, aumenta ao mesmo tempo que as concentrações de testosterona também aumentam durante a puberdade, havendo correlação positiva entre esses dois hormônios nessa fase. Assim, foi relatado que IGF-I pode ser usado como um indicador do início da puberdade na espécie bovina (RENAVILLE et al., 1993).

Outra substância, que mais recentemente tem sido alvo de discussões a respeito de seu papel no desenvolvimento sexual, é a leptina. Esta substância, também chamada de hormônio do tecido adiposo, é secretada por esse tecido e, lançada na corrente sanguínea, chega ao sistema nervoso central, na região do hipotálamo, onde atua informando ao cérebro sobre o estado nutricional do indivíduo. Como a maturidade sexual normalmente não ocorre até que o corpo tenha alcançado certo nível de desenvolvimento somático, acredita-se que a leptina possa agir como um gatilho metabólico para o início da puberdade e maturação do eixo reprodutivo (URBANSKI, 2001). No entanto, CHEUNG et al. (2001), conduzindo uma série de experimentos com ratos e camundongos,

chegaram a resultados que enfraquecem a hipótese de que a leptina age como um gatilho para o início da puberdade. Em vez disso, os resultados desses autores indicam que essa substância é um dos muitos fatores metabólicos que permitem o desenvolvimento puberal prosseguir.

Não há literatura disponível abordando o papel ou os níveis circulantes tanto da leptina quanto do IGF-I na puberdade e, ou, maturidade sexual dos cães. Os trabalhos que tratam da questão hormonal durante essas fases na espécie canina relatam as concentrações de andrógenos na circulação periférica (TAHA et al., 1981; TSUTSUI et al., 1987; MIALOT et al., 1988; TSUTSUI et al., 1990; GÜNZEL-APEL et al., 1994; INABA et al., 1994; KAWAKAMI et al., 1995), a liberação de testosterona induzida por GnRH exógeno (MIALOT et al., 1988; GÜNZEL-APEL et al., 1994), a concentração de andrógenos na veia espermática (TSUTSUI et al., 1990), o desenvolvimento de receptores para LH (INABA et al., 1994) e as concentrações plasmáticas de LH (MIALOT et al., 1988; GÜNZEL-APEL et al., 1994; KAWAKAMI et al., 1995).

Desse modo, MIALOT et al. (1988), analisando as concentrações plasmáticas de LH e três andrógenos, incluindo testosterona, em cães entre o nascimento e um ano de idade, verificaram que as concentrações de LH durante a puberdade foram as mais elevadas encontradas no período experimental. Observaram ainda que, nesse mesmo período, as concentrações dos andrógenos, embora mais elevadas que na infância, não superaram as do período pós-puberal, no qual as concentrações de LH decrescem e as dos três andrógenos aumentam até atingir um platô.

Corroborando MIALOT et al. (1988), GÜNZEL-APEL et al. (1994) também relataram concentrações plasmáticas significativamente mais elevadas de LH e valores mais baixos de testosterona em cães púberes, em comparação com cães adultos. Segundo esses autores, altas concentrações de LH em conjunto com baixas concentrações de testosterona em cães púberes, quando comparados com adultos, são indicativos de um imaturo eixo hipofisário-gonadal.

As mudanças nos níveis de andrógenos na veia espermática de cães durante o período de maturidade sexual são consistentes com as mudanças nos

níveis plasmáticos de andrógenos na circulação periférica encontrados por MIALOT et al. (1988) e GÜNZEL-APEL et al. (1994) (TSUTSUI et al., 1990). Estes mesmos autores analisaram, anteriormente, as concentrações plasmáticas de testosterona, 5 α -diidrotestosterona e androstenediona em cães do nascimento até a maturidade sexual. Nesta fase, as concentrações de 5 α -diidrotestosterona foram baixas, quando comparadas com as concentrações de testosterona, durante todo o período experimental. As concentrações de testosterona encontradas também foram, no geral, mais elevadas que as concentrações de androstenediona, evidenciando, assim, que a testosterona é o principal andrógeno atuante durante a puberdade e maturidade sexual na espécie canina (TSUTSUI et al., 1987).

De forma semelhante, INABA et al. (1994) também observaram concentrações mais elevadas de testosterona na circulação periférica do que as concentrações de androstenediona e 5 α -diidrotestosterona em cães com idade de duas semanas a dois anos. Esses autores, analisando também mudanças nas concentrações de receptores de LH nos testículos desses cães, encontraram que a aparente afinidade dos receptores de LH não muda significativamente com a idade. No entanto, o número total de receptores locais de LH aumenta continuamente com a idade e o crescimento dos testículos. Ao mesmo tempo, as concentrações dos andrógenos analisados aumentaram rapidamente com a elevação do número de receptores para LH nos testículos.

2.4.3. Qualidade seminal durante a puberdade e a maturidade sexual

Ao longo da puberdade e do período pós-puberal, a concentração espermática, a motilidade retilínea progressiva e o vigor dos espermatozoides tendem a aumentar de forma progressiva, ao mesmo tempo que a porcentagem de anormalidades espermáticas diminui (TAHA et al., 1981; LUNSTRA e ECHTERNKAMP, 1982; MIALOT et al., 1985; KUMI-DIAKA e ADEYANJU, 1986).

Assim, na espécie bovina, durante as primeiras seis semanas depois da puberdade foi observado um rápido aumento na motilidade progressiva e na

porcentagem de espermatozoides exibindo cabeças com morfologia normal. Ao mesmo tempo, foi relatado um rápido decréscimo na porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática distal, e com 12 semanas esses valores estão próximos daqueles observados em bovinos adultos (LUNSTRA e ECHTERNKAMP, 1982). Esses autores relataram, ainda, que a condição do acrossoma e a concentração espermática evoluíram mais lentamente e, com 16 semanas após a puberdade, ainda não atingem os valores da maturidade na espécie bovina.

EVANS et al. (1995) encontraram resultados semelhantes aos relatados por LUNSTRA e ECHTERNKAMP (1982) logo após a puberdade na espécie bovina. Analisando a qualidade espermática antes da puberdade, esses autores observaram que, em geral, também há um decréscimo na incidência de características morfológicas anormais nas células espermáticas nessa fase. Entretanto, os maiores decréscimos nessa fase foram na incidência de gota citoplasmática proximal e de *knobbed sperm defect* (anormalidade acrossômica).

Em cães, acentuado aumento na motilidade progressiva dos espermatozoides foi observado de duas a três semanas após a puberdade. Uma grande porcentagem de espermatozoides com patologias de cabeça e cauda dobrada foi observada nos primeiros ejaculados de cães na puberdade, ou pouco depois de esta ter sido atingida. Depois disso, a porcentagem de células espermáticas com anormalidades decresceu gradualmente no período pós-puberal (KAWAKAMI et al., 1995).

TAHA et al. (1981) observaram que, além de a porcentagem de células espermáticas patológicas decrescer no decorrer do período pós-puberal, a concentração espermática, o número total de espermatozoides no ejaculado, o volume e a libido dos cães aumentaram rapidamente nessa fase. Foi relatado ainda por esses autores que a principal patologia encontrada nos primeiros ejaculados foi gota citoplasmática. Isso é esperado, pois a presença de gota citoplasmática em um grande número de espermatozoides no ejaculado, durante essa fase de crescimento, é reconhecida como sinal de imaturidade (HAFEZ, 1995).

KUMI-DIAKA e ADEYANJU (1986) também relataram que as principais anormalidades morfológicas nas células espermáticas, encontradas durante o período pós-puberal em cães, foram cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática proximal. A porcentagem média do total de anormalidades encontrada na puberdade foi de 51,8% para uma raça nigeriana e de 54,5% para mestiços dessa raça com outras.

Em Fox Terrier, a porcentagem total de anormalidades encontrada durante a puberdade foi menor do que a obtida por KUMI-DIAKA e ADEYANJU (1986). Essa porcentagem foi de 20 a 40% até a quadragésima semana de idade (oito a seis semanas após a puberdade). Após essa idade, essa última porcentagem caiu para valores abaixo de 10 a 20%, e houve rápido aumento na concentração espermática e motilidade progressiva dos espermatozóides.

Quando os cães atingem a maturidade sexual, o padrão seminal é semelhante ao observado em cães adultos (KAWAKAMI et al., 1995; TAHA et al., 1981). Na espécie canina, amostra de sêmen de um animal adulto normal tem a proporção de defeitos maiores e menores – segundo a classificação de BLOM (1973) – de, no máximo, 30%, sendo que o total de defeitos maiores não deve ser superior a 10% (CBRA, 1998). Adicionalmente, a concentração espermática de um cão adulto normal tem de 200 milhões a 10 bilhões de espermatozóides no volume total do ejaculado (SEAGER, 1986; JOHNSTON, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996).

Segundo KAWAKAMI et al. (1995), o número total de espermatozóides no ejaculado de cães da raça Beagle aumenta até 35 semanas de idade e, depois, é mantida com valores superiores a 300 milhões. A motilidade espermática e a porcentagem de espermatozóides anormais no ejaculado desses cães são pouco variáveis após 38 semanas de idade. Os valores médios para motilidade progressiva são próximos ou iguais a 90%, e a porcentagem de espermatozóides anormais no volume total do ejaculado é menor que 10%.

2.4.4. Relação peso corporal e puberdade

O peso corporal tem sido considerado, em algumas espécies, um indicador de puberdade melhor que a idade cronológica (HAFEZ, 1995; PATTABIRAMAN, 1996). Assim, bovinos leiteiros atingem a puberdade quando seu peso corporal representa 30 a 40% do peso adulto, enquanto em gado de corte esta porcentagem é maior: 45 a 55% do peso adulto (Roy et al., 1975, citados por HAFEZ, 1995).

Segundo HAFEZ (1995), os níveis nutricionais controlam a idade à puberdade. Se o crescimento for acelerado por suplementação alimentar, o animal atinge a puberdade numa idade mais jovem. No entanto, se o crescimento for deficiente devido à subalimentação, a puberdade será retardada. Na espécie canina, quase não há relatos sobre a influência do peso na idade em que a puberdade é alcançada (TAHA et al., 1981). TAHA et al. (1981) observaram que a maturação física, determinada pelo peso corporal, não é necessariamente relacionada com o alcance da puberdade em cães. Esses autores chegaram a essa conclusão após observarem que houve diferença de 2,7 quilogramas entre os dois cães Beagle (num total de três), que chegaram à puberdade na mesma idade, 34 semanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação do descenso testicular

Foram utilizados nove cães filhotes da raça Retriever do Labrador, com idade inicial de nove semanas, hípidos e provenientes de proprietários particulares. Com relação à coloração da pelagem, cinco animais eram amarelos, dois pretos e dois chocolates. Os filhotes foram oriundos de cinco ninhadas de pais diferentes. Adicionalmente, outros sete filhotes com dois dias de idade foram utilizados para a avaliação da posição dos testículos nessa idade (Tabela 1).

Visitas semanais foram realizadas para a verificação da posição dos testículos pela palpação destes na região inguinal e no escroto. Os critérios adotados para tal averiguação foram: (1) não-palpáveis, (2) palpáveis na região do colo do escroto, (3) palpáveis próximos ao escroto e (4) palpáveis no escroto (Figura 1). O critério próximo ao escroto foi considerado como uma posição entre o colo e a posição final no assoalho do escroto. As palpações foram realizadas com os animais em estação e em decúbito dorsal e sempre após um contato inicial, para que os animais estivessem acostumados a ser tocados na região inguinal, prevenindo, assim, a retração involuntária dos testículos (RAVASZOVÁ et al., 1995).

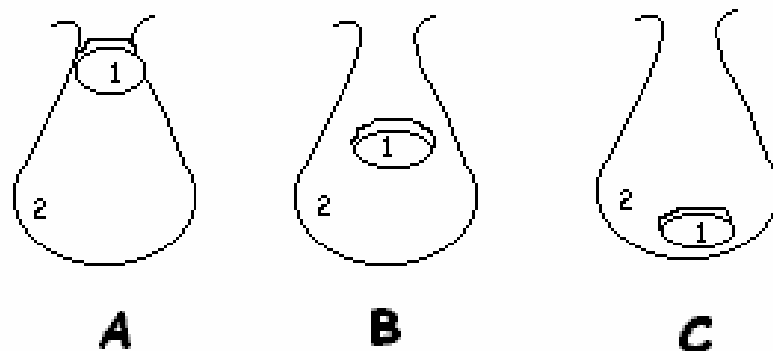


Figura 1 – Esquema dos critérios adotados para a verificação da posição do testículo (1) na região do escroto (2). A letra **A** representa o critério testículo palpável no colo do escroto; a letra **B**, palpável próximo ao escroto; e a letra **C**, palpável no escroto.

Foram calculados a média aritmética, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para cada um dos critérios adotados e registrados os resultados em número de semanas após o nascimento.

Avaliação da puberdade

Foram utilizados três animais da raça Retriever do Labrador, com idade inicial de 16 semanas, clinicamente saudáveis e provenientes de proprietários particulares. Outros dois cães também foram utilizados para avaliações no período pré-puberal, mas não foi possível acompanhá-los na possível idade em que atingiriam a puberdade (Tabela 1). Os animais foram alimentados, durante todo o período experimental, com ração comercial que atendia aos requerimentos nutricionais da espécie nesse período, duas a três vezes ao dia, e água *ad libitum*.

A coleta de sêmen foi realizada semanalmente, pelo método de manipulação digital. O ambiente utilizado para as coletas era tranquilo e contava apenas com a presença do profissional responsável e de, no máximo, três auxiliares. O local das coletas foi sempre o mesmo: uma sala isolada com ar-condicionado, que era ligado em dias quentes. Para a coleta foram utilizados tubos de centrífuga de vidro graduados, acoplados a funil plástico, ambos acondicionados em um recipiente de isopor contendo água a 37 °C e mantidos nesse recipiente durante toda a coleta (Figura 2).

Tabela 1 – Relação dos animais utilizados (X) nas avaliações do descenso testicular, da puberdade e da maturidade sexual

Cães	Descenso Testicular	Puberdade	Maturidade Sexual
01	X	X	X
02	X		X
03	X		X
04	X		
05	X		
06	X	X	X
07	X		
08	X		
09	X		
10		X	X
Sete filhotes**	X		

** Utilizados apenas para avaliar a posição dos testículos dois dias após o nascimento.



Figura 2 – Material utilizado para coleta de sêmen: funil plástico acoplado a um tubo de centrífuga de vidro graduado, ambos acondicionados dentro de um recipiente de isopor contendo água a 37 °C.

Para verificar a presença de espermatozóides nos ejaculados, uma alíquota de sêmen foi colocada em uma lâmina previamente aquecida e coberta por uma lamínula também previamente aquecida e, posteriormente, examinada em microscopia óptica de contraste de fase¹ em aumentos de 200 e 400 vezes. Se não fosse detectado nenhum espermatozóide pelo exame em microscopia óptica de contraste de fase, o ejaculado era centrifugado a 700 g por cinco minutos. A maior parte do líquido sobrenadante era descartada e o sedimento, ressuspendido no restante. Uma alíquota dessa suspensão era colocada em uma lâmina, coberta por uma lamínula e examinada em microscópio de contraste de fase com aumentos de 200 e 400 vezes.

A puberdade foi considerada a idade na qual os primeiros espermatozóides apareceram no ejaculado (TAHA et al., 1981; MIALOT et al., 1985; KAWAKAMI et al., 1995).

Foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação da idade do aparecimento dos primeiros espermatozóides no ejaculado, sendo os valores registrados em número de semanas.

Avaliação da maturidade sexual

Foram utilizados cinco cães da raça Retriever do Labrador, clinicamente saudáveis e provenientes de proprietários particulares. Três desses animais foram avaliados anteriormente, na puberdade (Tabela 1).

Todos os animais foram alimentados com ração comercial que atendia aos requerimentos nutricionais da espécie no período experimental de duas a três vezes ao dia e água *ad libitum*.

A coleta de sêmen foi realizada semanalmente pelo método de manipulação digital. O ambiente utilizado para as coletas era tranquilo e contava apenas com a presença do profissional responsável e de, no máximo, três auxiliares. O local das coletas foi sempre o mesmo: uma sala isolada com ar-condicionado, que era ligado em dias quentes. Para a coleta foram empregados

¹ Olympus-BX41.

tubos de centrífuga de vidro graduados, acoplados a funil plástico, ambos acondicionados em um recipiente de isopor contendo água a 37 °C e mantidos nesse recipiente durante toda a coleta (Figura 2). As frações do ejaculado foram todas coletadas no mesmo recipiente até o término completo da ejaculação.

A coleta de sêmen de um dos cães durante o período pós-puberal foi realizada na presença de uma cadela que não estava em estro. Essa fêmea, por ser de pequeno porte, foi mantida no colo de um auxiliar com os membros pélvicos e a região da vulva voltados para frente do animal durante todo o procedimento.

Imediatamente após a coleta foram registrados o volume do ejaculado, o turbilhonamento, a motilidade progressiva retilínea e o vigor dos espermatozoides. O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo de centrífuga graduado e registrado em mililitros (mL).

A mensuração da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer e o sêmen, diluído de acordo com o aspecto microscópico inicial do ejaculado. Para sêmen com aspecto aparentemente muito concentrado durante a observação da motilidade progressiva, foi utilizada a diluição de 10 µL de sêmen em 2,0 ou 3,0 mL de solução de formol salina tamponada (HANCOCK, 1957). Para sêmen com aspecto pouco concentrado foi utilizada a diluição de 1 µL de sêmen em 19 µL de formol salina tamponada ou 10 µL de sêmen em 190 µL de formol salina tamponada, dependendo do volume do ejaculado. O número total de espermatozoides no ejaculado foi obtido, multiplicando-se o volume do sêmen ejaculado (em mL) pela concentração espermática por mL (FELDMAN e NELSON, 1996).

Uma alíquota de sêmen foi colocada em uma lâmina de vidro mantida, à temperatura de 37 °C, em placa aquecedora, para a observação do turbilhonamento em microscopia óptica de contraste de fase em aumento de 100 vezes. Foi atribuída uma escala de 0 a 5 entre os valores mínimos e máximos, respectivamente (CBRA, 1998).

Outra alíquota de sêmen foi colocada em uma lâmina de vidro, posteriormente coberta por uma lamínula de vidro, ambas mantidas à temperatura de 37 °C, em placa aquecedora, para a observação da motilidade progressiva

retilínea dos espermatozoides, realizada em microscopia óptica de contraste de fase em aumento de 200 vezes, sendo registrada em dados percentuais. Para uma melhor visualização, algumas alíquotas de sêmen foram diluídas na própria lâmina com BTS (PURSEL e JOHNSON, 1975) previamente aquecido a 37 °C. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozoides (vigor) foi realizada em microscopia óptica de contraste de fase em aumento de 200 vezes, atribuindo escala de 0 a 5 entre os valores mínimos e máximos observados, respectivamente (CBRA, 1998).

Para avaliação da morfologia espermática e da condição do acrossoma foram utilizados esfregaços corados e preparação úmida. Esses esfregaços foram realizados em lâminas de vidro mantidas a 37 °C, fazendo-se uma gota de sêmen correr sobre elas, no momento de seu estiramento, por trás de outra lâmina elevada obliquamente a um ângulo de 45° em relação à que recebe o esfregaço. A coloração foi feita utilizando um corante panótico rápido e uma metodologia modificada de JOHNSTON et al. (2001). O procedimento foi realizado da seguinte forma: após a confecção do esfregaço, o mesmo foi secado em temperatura ambiente e mergulhado posteriormente, de forma sucessiva, em cada uma das soluções de corante por 30 segundos. Em seguida, o lado da lâmina oposto ao esfregaço foi secado utilizando um papel absorvente, e não foi feito o enxágüe da lâmina, que foi colocada em um suporte para que fosse secada em temperatura ambiente. A observação da morfologia espermática foi realizada em microscopia óptica comum em um aumento de 1.000 vezes. Foram contadas 200 células e registrados os defeitos de cabeça em porcentagem, de acordo com a classificação de BLOM (1973).

A preparação úmida foi realizada colocando-se gotas de sêmen em um frasco contendo 1,0 ou 0,5 mL de solução de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957) até a obtenção de um aspecto leitoso do preparado. Foi colocada uma gota dessa solução em uma lâmina de vidro, cobrindo-a imediatamente com uma lamínula. Um papel-filtro foi aplicado a esse conjunto, pressionando suavemente a lamínula até que o excesso de líquido fosse absorvido. A análise foi realizada em microscopia de contraste de fase num

aumento de 1.000 vezes (CBRA, 1988). Foram observadas 200 células, analisando-se defeitos de forma e estrutura, conforme sua distribuição no acrossoma ou cauda (peça intermediária e principal), os quais foram registrados em porcentagem.

As anormalidades foram, posteriormente, classificadas em defeitos maiores e menores (BLOM, 1973). Nas células que apresentavam mais de um defeito maior, ambos foram contados.

A maturidade sexual foi considerada alcançada quando o sêmen atingiu os padrões considerados normais para a espécie e estes tenderam a estabilizar-se. Foi considerada como normal a concentração espermática acima de 200 milhões no volume total do ejaculado (SEAGER, 1986; JOHNSTON, 1991; FELDMAN e NELSON, 1996); a motilidade espermática progressiva superior a 70% em uma amostra de sêmen *in natura* (FELDMAN e NELSON, 1996); e a morfologia espermática com a proporção de defeitos maiores e menores de no máximo 30%, sendo o total de defeitos maiores não superior a 10% (CBRA, 1998).

Foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação da idade em que os animais alcançaram a maturidade sexual e registrados os valores em número de semanas. Realizou-se a análise de regressão das variáveis estudadas em função da idade, por meio do programa estatístico SAEG (EUCLYDES, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Descenso testicular

Os testículos dos sete cães da raça Retriever do Labrador não foram palpáveis na região inguinal no segundo dia após o nascimento. Essa observação está, em parte, de acordo com BAUMANS et al. (1981), que relataram que os testículos de cães são palpáveis somente a partir dos dias 15 a 17 após o nascimento, quando estão no meio do trajeto entre o anel inguinal superficial e o escroto.

Os testículos foram palpáveis na região do colo do escroto na décima semana de idade ($10 \pm 0,44$), permanecendo palpáveis nessa região até a décima segunda semana ($12 \pm 0,78$). Encontraram-se coeficientes de variação dos limites inferior e superior de 4,51 e 6,45%, respectivamente (Tabela 2).

Próximo ao escroto, os testículos foram palpáveis na décima terceira semana de idade ($13 \pm 0,78$) até a décima quinta ($15 \pm 0,78$), com coeficientes de variação dos limites inferior e superior de 5,96 e 5,17%, respectivamente (Tabela 2).

Os coeficientes de variação dos critérios palpáveis na região do colo do escroto e próximos a este foram muito baixos no presente experimento, o que aumenta a credibilidade dos dados aqui apresentados.

Tabela 2 – Idade média ou intervalos de idades médias (semanas) em que os testículos de nove cães da raça Retriever do Labrador foram palpáveis no colo do escroto, próximo ao escroto e no escroto

Posição dos Testículos	Idade Média (semanas)		Desvio-Padrão		Coeficiente de Variação (%)	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS
Colo do escroto	10	12	0,44	0,78	4,51	6,45
Próximo ao escroto	13	15	0,78	0,78	5,96	5,17
No escroto	16		0,78		4,85	

LI e LS são as idades médias em que os testículos foram palpados nas posições indicadas pela primeira e última vez, respectivamente.

Esses resultados diferem dos encontrados na literatura (BAUMANS et al., 1981; KAWAKAMI et al., 1993; RAVASZOVÁ et al., 1995), que, no entanto, são divergentes entre si. BAUMANS et al. (1981) e KAWAKAMI et al. (1993) observaram que os testículos são palpáveis próximos ao escroto entre 20 e 25 e 30 dias após o nascimento, respectivamente. BAUMANS et al. (1981) verificaram também que os testículos passam pelo canal inguinal no quinto dia depois do nascimento, sendo palpáveis na região do colo do escroto depois de 15 a 17 dias após o nascimento. Entretanto, RAVASZOVÁ et al. (1995) relataram que em 90% dos casos estudados os testículos deixaram o canal inguinal 36 a 37 dias após o nascimento. Dessa forma, estes devem ter sido palpados no colo do escroto poucos dias depois de passarem pelo canal inguinal.

Essas divergências na literatura podem ser um reflexo da metodologia adotada. Dessa forma, BAUMANS et al. (1981) e KAWAKAMI et al. (1993) trabalharam com a topografia dos testículos ao longo do trajeto de descida. De forma geral, eles mensuraram as distâncias entre os testículos e o anel inguinal profundo e entre os testículos e o anel inguinal superficial. Os resultados desses dois trabalhos foram próximos. Já RAVASZOVÁ et al. (1995), trabalhando com palpação dos testículos na região inguinal e no escroto, de maneira semelhante à

metodologia adotada no presente estudo, encontraram resultados diferentes dos apresentados por aqueles autores e nesta pesquisa.

Uma das possíveis explicações para as diferenças encontradas por RAVASZOVÁ et al. (1995) com relação aos resultados do presente trabalho está no fato de que existem os problemas inerentes ao emprego somente da palpação como metodologia para verificação da descida testicular. Apesar de ser esse o procedimento utilizado na rotina para diagnosticar criptorquidismo (JOHNSTON et al., 2001), o emprego dessa técnica pode apresentar algumas dificuldades. Estas são, no geral, devidas ao pequeno tamanho dos testículos na fase inicial da vida dos filhotes, ao pequeno tamanho do neonato, ao pouco desenvolvimento escrotal e à presença de gordura no escroto, além da possível retração involuntária dos testículos (FELDMAN e NELSON, 1996).

Neste experimento, a presença de gordura subcutânea no escroto não foi confundida com a dos pequenos testículos. Foi notada, no escroto, gordura em pequena quantidade, que antes da descida dos testículos desapareceu. De forma semelhante, BAUMANS et al. (1981) observaram que a gordura subcutânea do escroto desaparece antes de a descida testicular completar-se, deixando um espaço para os testículos.

Segundo JOHNSTON et al. (2001), a retração testicular involuntária ocorre como consequência da contração do músculo cremaster, que traciona os testículos para o canal inguinal quando os filhotes estão assustados, estressados ou com medo. Assim, essa retração foi evitada no presente experimento, condicionando os filhotes a ser tocados na região inguinal. Como comprovação de que a retração não ocorreu, a cada observação semanal os testículos foram palpáveis na mesma posição ou numa posição cada vez mais próxima ao escroto.

Como esses problemas também foram contornados por RAVASZOVÁ et al. (1995), as divergências nos resultados são, provavelmente, devidas às diferenças na cronologia do descenso testicular entre as raças caninas selecionadas para o referido estudo e o presente experimento.

Os testículos dos cães Retriever do Labrador foram palpáveis no escroto na décima sexta semana de idade ($16 \pm 0,78$), com um coeficiente de variação de

4,85%, que aumenta o grau de confiabilidade dos resultados deste estudo (Tabela 2).

Considerando a idade em que a descida dos testículos é completada, os resultados da literatura são bastante conflitantes. Dessa forma, Wensing (1968), citado por RAVASZOVÁ et al. (1995), acredita que os testículos de cães encontram-se no escroto entre cinco e seis dias após o nascimento. Já BAUMANS et al. (1981) e KAWAKAMI et al. (1993) observaram os testículos de cães no escroto aos 35 dias após o nascimento, enquanto RAVASZOVÁ et al. (1995) verificaram que em mais de 97% dos cães estudados o descenso testicular ocorreu aos 42 dias após o nascimento.

Apesar de nenhum desses autores terem observado diferenças entre raças com relação ao descenso testicular, há cerca de 400 raças de cães com ampla variedade de tamanhos e conformações corporais, sendo possível que tais diferenças existam. Há relatos na literatura de que a descida testicular em cães da raça Shetland Sheepdog frequentemente prolonga-se até os dois anos de idade sem afetar a fertilidade (Riemann, 1978; Streun, 1978, citados por RAVASZOVÁ et al., 1995). Provavelmente o anel inguinal dessa raça feche mais tardiamente que a média considerada para a espécie, que é aos seis meses de idade (JOHNSTON et al., 2001).

Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura abordando a questão do descenso testicular na raça Retriever do Labrador. Dessa forma, o descenso testicular nesta raça, conforme o constatado no presente experimento, pode ocorrer mais tardiamente que nas raças estudadas por alguns autores (BAUMANS et al., 1981; KAWAKAMI et al., 1993; RAVASZOVÁ et al., 1995), porém com ocorrência mais precoce que na raça Shetland Sheepdog (Riemann, 1978; Streun, 1978, citados por RAVASZOVÁ et al., 1995).

Puberdade e maturidade sexual

Os cães já apresentavam ereção e exposição peniana completa após a manipulação digital desde o início do experimento (16 semanas de idade). Essa

reação foi observada muito antes de os cães atingirem a capacidade ejaculatória (Figura 3). Ereção peniana intraprepuçial completa foi também verificada sem que houvesse a manipulação do pênis, quando os animais estavam alegres ou brincando. Um dos cães só tinha ereção completa após lambe o próprio pênis, comportamento que persistiu até mesmo após o animal ter atingido a puberdade.



Figura 3 – Cão pré-púbere Retriever do Labrador (26 semanas de idade) apresentando ereção peniana completa.

Comportamento semelhante foi verificado em ratos. A espécie apresenta um tipo de ereção denominada “ereção peniana espontânea”, que é observada antes de os animais atingirem a capacidade de ejacular. Essa condição é observada em ratos quando estão na ausência de fêmeas. Os roedores têm esse comportamento após realizarem a limpeza genital, quando estão dormindo, comendo ou brincando. As ereções espontâneas aumentam com o início da puberdade e parecem ter um papel importante na preparação dos machos para a reprodução (HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, 2000).

Além da ereção, um cão apresentou movimentos pélvicos intensos, simulando coito, com 25 semanas de idade, antes de possuir a capacidade ejaculatória (Figura 4). Esses movimentos aumentaram de intensidade durante as coletas de sêmen após a puberdade, com a aproximação da maturidade sexual. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ (2000) também verificou esse tipo de reação em ratos, cujo comportamento de monta e cuja capacidade de ejacular foram observados com 54,5 e 59 dias de idade, respectivamente. Adicionalmente, esses autores verificaram também que os animais antes de apresentarem esse comportamento de monta, e acompanhando as ereções penianas espontâneas, davam leves estocadas, que eram seguidas por essas ereções. Assim, tanto o cão quanto o rato apresentam ereção completa antes de atingir a capacidade ejaculatória. Três cães do presente experimento exibiram pulsações uretrais sem que houvesse ejaculação no período pré-puberal. Isso pode ser explicado pelo fato de a próstata não possuir capacidade secretora nessa fase e de o processo de espermatogênese ainda não ter sido iniciado (KAWAKAMI et al., 1991).



Figura 4 – Cão pré-púbere Retriever do Labrador (26 semanas de idade) com movimentos pélvicos intensos simulando coito.

Segundo KAWAKAMI et al. (1991), os primeiros espermatozóides foram observados nos túbulos seminíferos de cães Beagle na idade de 26 a 28 semanas. Adicionalmente, as células epiteliais da próstata desses cães só apresentaram secreção PAS-positiva depois de 24 semanas de idade. O primeiro ejaculado desses cães foi obtido por esses autores entre 27 e 29 semanas de idade.

No presente estudo, o primeiro ejaculado foi obtido com a idade média de 29 semanas ($29 \pm 0,54$). Tais ejaculados, além de volume muito reduzido (em média 0,13 mL), apresentavam quantidade muito pequena de espermatozóides, não sendo possível mensurar a concentração espermática nem coletar amostras para análise de morfologia espermática. A puberdade foi considerada alcançada nessa idade, com um coeficiente de variação de 1,88%.

O volume muito reduzido pode ser explicado em razão de o desenvolvimento completo da próstata ainda não ter sido atingido quando os cães chegam à puberdade. Tais observações foram registradas por KAWAKAMI et al. (1995), que relataram que a próstata de cães da raça Beagle continua seu desenvolvimento após a puberdade. Somente depois de 32 semanas de idade que é visualizada secreção PAS-positiva em quantidade maior no lúmen glandular. De forma geral, o volume dos ejaculados variou bastante de animal para animal, tendo oscilações no decorrer de todo o período experimental. No entanto, com a aproximação da maturidade sexual foram obtidos volumes mais elevados dos ejaculados. Tais oscilações foram também constatadas por MIALOT et al. (1985) e KAWAKAMI et al. (1995), podendo ser explicadas pela variação no grau de excitação dos animais nas diferentes coletas.

Quanto ao fato de poucos espermatozóides terem sido visualizados nos ejaculados na puberdade, TAHA et al. (1981) observaram algo semelhante em cães da raça Beagle. Segundo eles, no primeiro ejaculado obtido de um dos animais a concentração espermática e o número total de espermatozóides por ejaculado não puderam ser mensurados. Isso é esperado, porquanto na puberdade em cães, apesar de as concentrações de LH serem elevadas, as concentrações de testosterona são relativamente baixas (MIALOT et al., 1988), revelando, assim,

um imaturo eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e, conseqüentemente, uma função espermatogênica que ainda não atingiu sua plenitude.

Logo após a puberdade, as porcentagens médias de defeitos totais e defeitos maiores foram bastante elevadas e diminuíram, de forma não linear, com a aproximação da maturidade sexual, quando, então, foram estabilizadas (Figura 5). O modelo de regressão que melhor explica o comportamento dos defeitos totais (DT) é o quadrático em função da idade em semanas ($DT = 779,9 - 35,4^{**} X + 0,4^{**} X^2$, $R^2 = 99,5\%$, $** - P < 0,01$). De forma semelhante, o modelo de regressão que melhor explica o comportamento dos defeitos maiores (DM) também é o quadrático em função da idade em semanas ($DM = 613,7 - 28,4^{**} X + 0,3^{**} X^2$, $R^2 = 97,3\%$, $** - P < 0,05$).

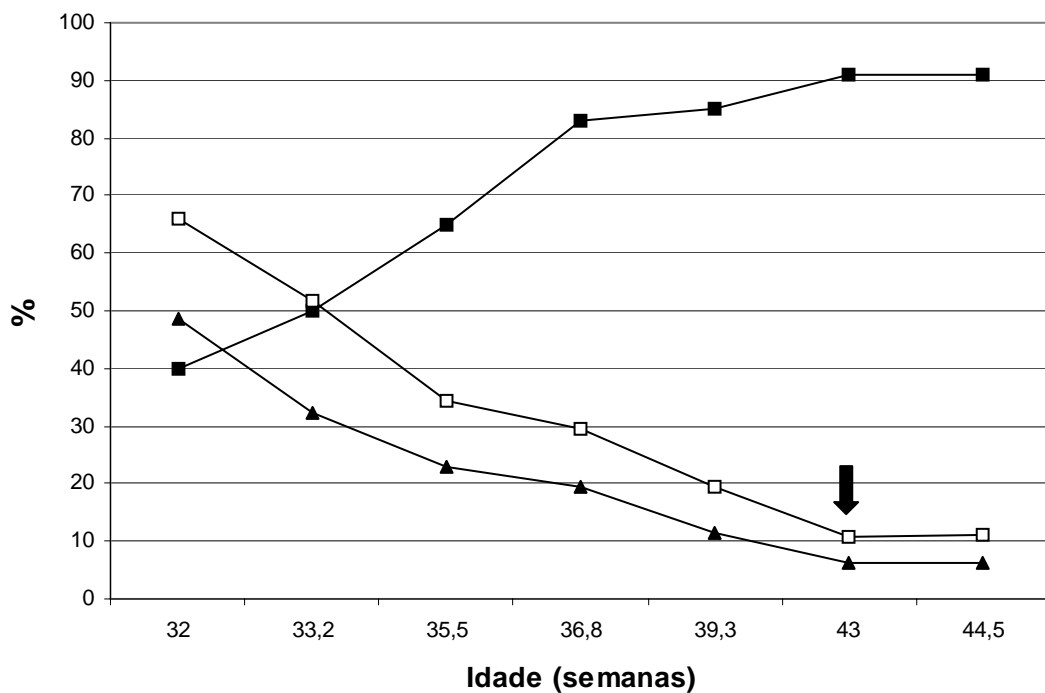


Figura 5 – Gráfico das mudanças na porcentagem média de motilidade espermática progressiva retilínea (—■—), porcentagem média de defeitos maiores (—▲—) e porcentagem média de defeitos totais (—□—), no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual.

A média de motilidade espermática progressiva foi, no entanto, baixa e aumentou com a aproximação da maturidade sexual, quando, então, se manteve estabilizada num platô elevado (Figura 5). Houve elevação menor da motilidade retilínea progressiva na idade de 39,3 semanas, comportamento esse considerado fisiologicamente normal. Além disso, fatores adversos, como a temperatura ambiental, podem interferir na análise desse parâmetro. O modelo de regressão que melhor explica o comportamento da motilidade progressiva (MOT) é o quadrático em função da idade em semanas ($MOT = - 777,6 + 41,0^{**} X - 0,5^{**} X^2$, $R^2 = 97,6\%$ ** - $P < 0,01$).

A média de vigor espermático também foi baixa, não sendo observado turbilhonamento – movimento de massa dos espermatozóides em forma de ondas – nos primeiros ejaculados após a puberdade. Esses dois parâmetros se elevaram no decorrer do período pós-puberal (Figura 6). O modelo de regressão que melhor explica o comportamento do turbilhonamento (TURB) é o linear em função da idade em semanas ($TURB = - 6,78 + 0,21^{**} X$, $R^2 = 92,9\%$ ** - $P < 0,01$). De forma semelhante, o modelo de regressão que melhor explica o comportamento do vigor espermático (VIG) é o linear em função da idade em semanas ($VIG = - 3,57 + 0,17^{**} X$, $R^2 = 91,4\%$ ** - $P < 0,01$).

Resultados semelhantes foram obtidos por MIALOT et al. (1985) e KAWAKAMI et al. (1995), com a ressalva de que estes últimos autores não observaram turbilhonamento no sêmen de cães da raça Beagle em nenhum momento após a puberdade e na idade da maturidade sexual. Isso pode ser explicado pelos valores de concentração espermática mais baixos dos ejaculados obtidos por eles. Como a concentração espermática canina pode variar de acordo com a raça (JONHSTON et al., 2001), no presente estudo os cães da raça Retriever do Labrador apresentaram como padrão concentração espermática por mL e número total de espermatozóides no ejaculado mais elevados que os da raça Beagle.

Ainda, segundo MIALOT et al. (1985), há um aumento rápido, mas irregular, na concentração espermática de cães durante o período pós-puberal, e a média da concentração espermática flutua marcadamente de acordo com a idade.

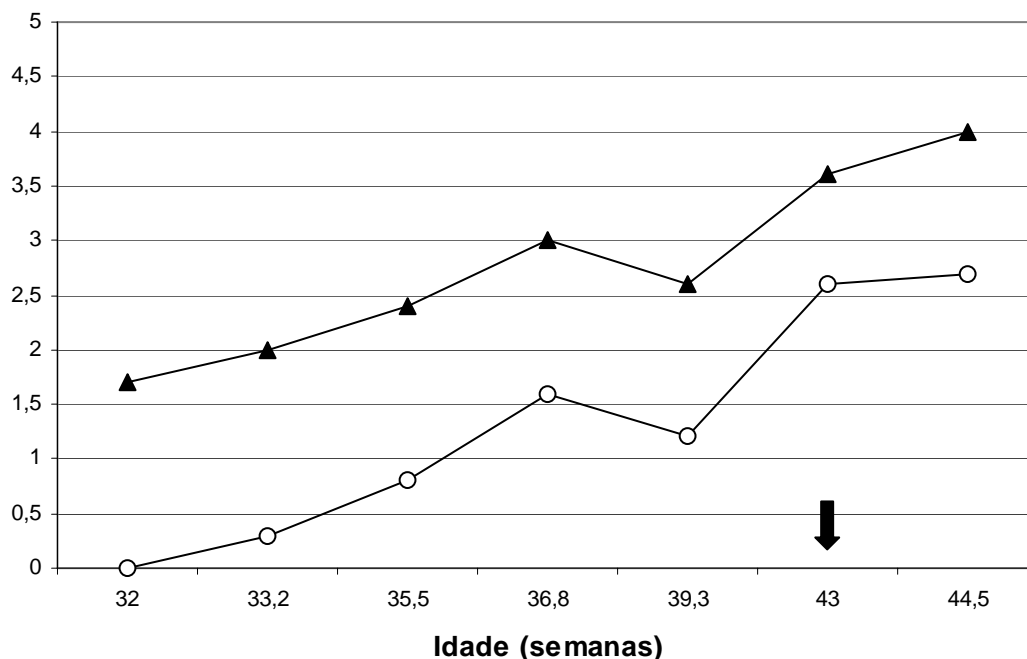


Figura 6 – Gráfico das mudanças nos valores médios do vigor espermático (—▲—) e turbilhonamento (—○—) – movimento de massa dos espermatozóides em forma de ondas –, no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual.

Conseqüentemente, as mudanças no número total de espermatozóides por ejaculado são bastante semelhantes às que ocorrem na concentração espermática por mL.

Essas observações são similares aos resultados encontrados no presente experimento, no qual a média da concentração espermática por mililitro também aumentou no decorrer do período pós-puberal e oscilou de acordo com a idade, mas de forma menos acentuada (Figura 7). O mesmo foi visto com a média do número total de espermatozóides no ejaculado (Figura 8). Essas oscilações podem ocorrer quando se faz avaliação da qualidade seminal, pois, como foi discutido anteriormente, vários fatores, como o estresse do animal durante as coletas, podem interferir na ejaculação. O modelo de regressão que melhor explica o comportamento da concentração espermática por mL (CONC) é o

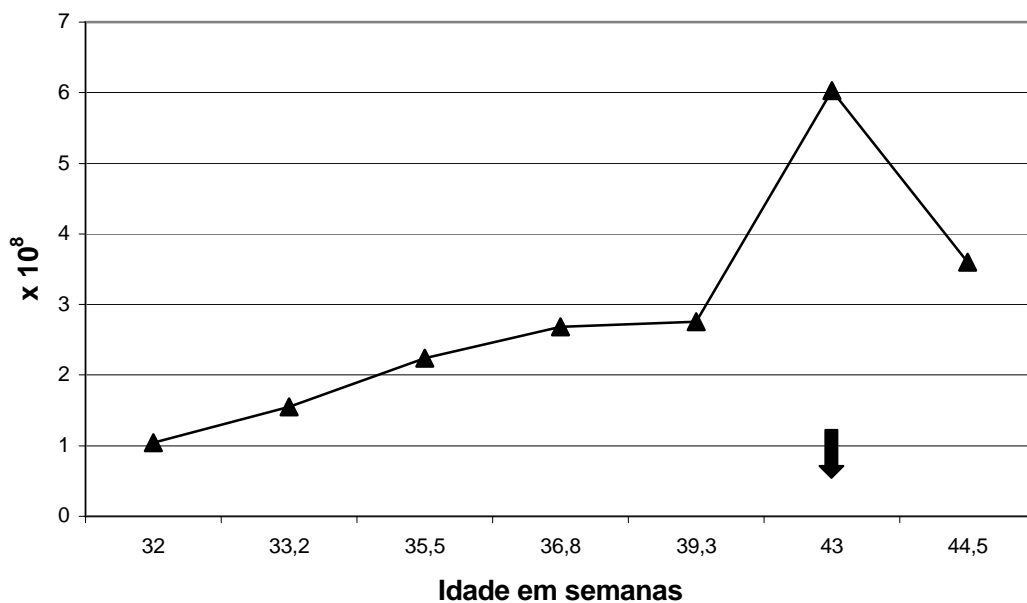


Figura 7 – Gráfico das mudanças nos valores médios da concentração espermática por mililitros (-▲-), no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual.

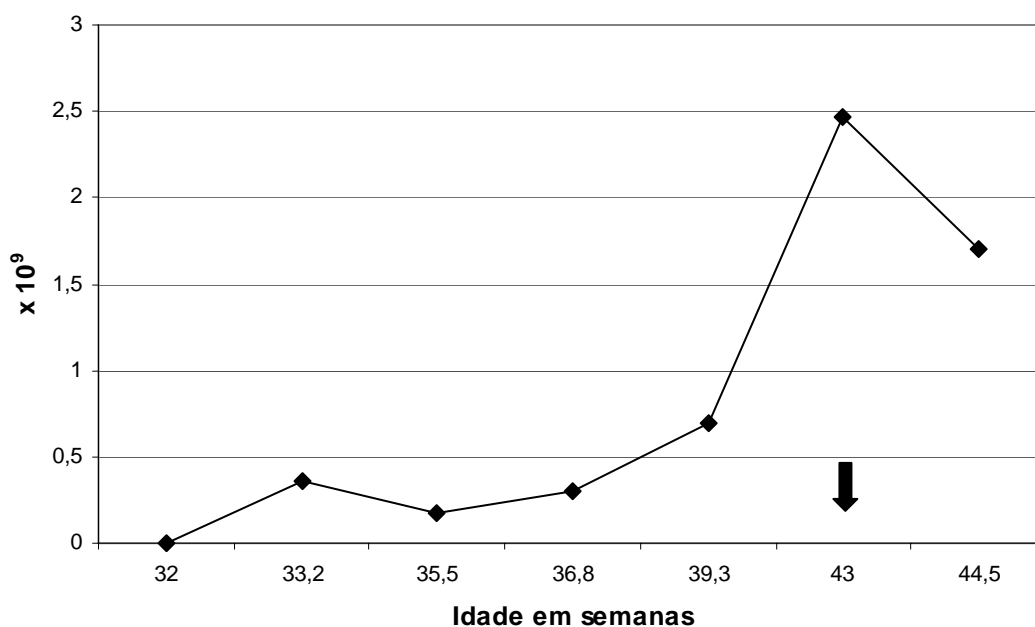


Figura 8 – Gráfico das mudanças nos valores médios do número total de espermatozóides no ejaculado (-◆-), no período pós-puberal até a maturidade sexual de cães da raça Retriever do Labrador. A seta indica a idade em que os cães atingiram a maturidade sexual.

linear em função da idade em semanas ($CONC = - 8,88 + 0,31^{**} X$, $R^2 = 78,3\%$, $** - P < 0,01$). Da mesma forma, o modelo que melhor explica o comportamento do número total de espermatozóides no ejaculado (TOT) também é o linear em função da idade em semanas ($TOT = - 5,65 + 0,17^{**} X$, $R^2 = 78,1\%$, $** - P < 0,01$). De acordo com a análise estatística, tais parâmetros aumentaram progressivamente com a idade, apesar das oscilações.

Na idade de 43 semanas houve aumento acentuado na concentração espermática por mililitro e no número total de espermatozóides por ejaculado e, posteriormente, também uma queda nesses valores. Essa queda pode ser explicada pelo grau de excitação dos animais nas diferentes coletas, interferindo no volume dos ejaculados. Além disso, tais parâmetros, apesar de terem alcançado valores normais para um animal adulto, não se estabilizaram no período experimental. Essa não-estabilização dos valores de concentração espermática e do número total de espermatozóides por ejaculado pode ser explicada pelo fato de que os túbulos seminíferos atingem a capacidade máxima de produção espermática nos cães entre três e seis anos (PAULA e CARDOSO, 1994).

Com relação às anormalidades, as mais encontradas logo após a puberdade foram, em ordem decrescente: patologias de acrossoma e formas teratológicas; subdesenvolvido; gota citoplasmática proximal; e coloração anormal. Entre as anormalidades espermáticas consideradas como defeitos menores, as mais encontradas nesse período foram, em ordem decrescente: gota citoplasmática distal, cabeça pequena normal, cabeça gigante e cauda dobrada ou enrolada.

KAWAKAMI et al. (1995) observaram grande número de espermatozóides com cabeça pequena ou gigante e cauda dobrada no ejaculado de cães logo após a puberdade. No presente experimento também foram verificados muitos espermatozóides com tais anormalidades. Segundo BARTH e OKO (1989), há evidências de que essas patologias acontecem em função de uma divisão desigual dos cromossomos, que pode ocorrer durante a metáfase da meiose e, em animais adultos, pode ter causas adversas, como mudança de ambiente, febre ou orquite crônica. Entretanto, em cães no período pós-puberal, o

aparecimento dessas anormalidades pode ser explicado pelo imaturo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal nessa fase, interferindo no controle hormonal da espermatogênese pelo FSH e pela testosterona. Como esses hormônios atuam no desenvolvimento do espermatozóide, abrangendo a meiose (McLACHLAN, 2000), qualquer falha nesse processo poderia resultar em anomalias espermáticas, como cabeça pequena e, ou, gigante.

Já o aparecimento de gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal no período pós-puberal é esperado, pois a presença dessas patologias em um número considerável de espermatozóides é sinal de imaturidade epididimária (HAFEZ, 1995).

Inicialmente, a porcentagem média de gota citoplasmática proximal foi muito mais elevada que a de gota citoplasmática distal. Com a idade média de 33 semanas, houve queda na porcentagem média de gota citoplasmática proximal, e a porcentagem de gota citoplasmática distal tornou-se maior. Essa inversão de anomalias é provavelmente um reflexo da maturação do epidídimo. Segundo KAWAKAMI et al. (1995), o epidídimo de cães da raça Beagle apresenta acentuado desenvolvimento no período pós-puberal.

Outras patologias que têm alguma relação com a maturação do epidídimo são as de acrossoma. Essas anormalidades, juntamente com formas teratológicas, foram as mais encontradas logo após a puberdade e tiveram queda acentuada na idade média de 33 semanas (quatro semanas após a puberdade). Essa queda se deu na mesma idade em que houve diminuição na quantidade de gota citoplasmática proximal nos ejaculados. Como a remoção dessa gota e algumas modificações associadas com a maturação do acrossoma ocorrem no epidídimo (HAFEZ, 1995) e essas ações são dependentes da testosterona (EVANS et al., 1995), provavelmente houve aumento nos níveis desse hormônio nos cães com idade de 33 semanas.

No presente experimento não foi possível dosar as concentrações plasmáticas de testosterona dos cães, em virtude de estes serem de proprietários particulares e não estarem disponíveis no horário ideal para coleta das amostras sanguíneas. No entanto, TSUTSUI et al. (1987), MIALOT et al. (1988) e

KAWAKAMI et al. (1995) observaram altas concentrações plasmáticas de testosterona em cães machos depois de 30 semanas de idade.

O aparecimento de formas teratológicas nos ejaculados também teve uma frequência elevada nos primeiros ejaculados e queda acentuada nos de cães com 33 semanas de idade. O aparecimento de grande número de anormalidades espermáticas, como formas teratológicas e espermatozóides subdesenvolvidos nos ejaculados do início do período pós-puberal, está relacionado com espermatogênese imperfeita, que, por sua vez, é dependente da testosterona. Dessa forma, um possível aumento na concentração da testosterona pode ter levado à queda na frequência de formas teratológicas nos ejaculados de cães com 33 semanas de idade. Diminuição acentuada também foi observada com relação ao aparecimento de espermatozóides subdesenvolvidos nos ejaculados.

A frequência, no entanto, de coloração anormal nos ejaculados oscilou pouco ao longo do período pós-puberal mas permaneceu elevada até a trigésima sexta semana de idade. Após esse período houve queda acentuada até a maturidade sexual. Como a coloração anormal é uma patologia espermática de cabeça relacionada a danos na membrana e condensação cromossômica, a presença de grande quantidade de células com essa patologia também é um reflexo de espermatogênese imperfeita. Talvez o desaparecimento dessa anormalidade exija um grau maior de maturidade testicular do que o encontrado antes das 36,3 semanas de idade.

Dessa forma, os cães da raça Retriever do Labrador alcançaram a maturidade sexual com a idade média de 43 semanas ($43 \pm 1,12$), com um coeficiente de variação muito baixo ($CV=2,58$), indicando que esse resultado pode ser extrapolado para a raça como um todo.

4. CONCLUSÕES

Os testículos de cães da raça Retriever do Labrador são palpáveis no colo do escroto da décima semana de idade até a décima segunda, enquanto próximo ao escroto o são da décima terceira até a décima quinta. O descenso testicular na raça completa-se na décima sexta semana de idade.

A puberdade é atingida com 29 semanas de idade e a maturidade sexual, com 43 semanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; HUTSON, J.M. Gonadal migration in ambiguous genitalia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 9, p. 547-550, 1994.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Ames, EUA: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BAUMANS, V.; DIJKSTRA, G.; WENSING, C.J.G. Testicular descent in the dog. **Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.**, v. 10, p. 97-110, 1981.

BAUMANS, V.; DIJKSTRA, G.; WENSING, C.J.G. The role of a non-androgenic factor in the process of testicular descent in the dog. **Int. J. Androl.**, v. 6, p. 541-552, 1983.

BAUMANS, V.; DIELEMAN, S. J.; WOUTERSE, H.S. et al. Testosterone secretion during gubernacular development and testicular descent in the dog. **J. Reprod. Fert.**, v. 53, p. 21-25, 1985.

BEHRINGER, R.R.; FINEGOLD, M.J.; CATE, R.L. Mullerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. **Cell.**, v. 79, p. 415-425, 1994.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaarmed.**, v. 25, p. 383-391, 1973.

CAIN, M.P.; KRAMER, S.A.; TINDALL, D.J.; HUSMANN, D.A. Flutamide-induced cryptorchidism in the rat is associated with altered gubernaculum morphology. **Urology.**, v. 46, p. 553-558, 1995.

CHEMES, H.E.; GOTTLIEB, S.E.; PASQUALINI, T. et al. Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. **J. Androl.**, v. 6, n. 2, p. 102-112, 1985.

CHEUNG, C.C.; THORNTON, J.E.; NURANI, S.D. et al. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in rat and mouse. **Neuroendocrinol.**, v. 74, p. 12-21, 2001.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

COLENBRANDER, B.; De JONG, F.H.; WENSING, C.J.G. Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development. **J. Reprod. Fertil.**, v. 53, p. 377-380, 1978.

ELDER, J.S.; ISAACS, J.T.; WALSH, P.C. Androgenic sensitivity of the gubernaculum testis: Evidence for hormonal/mechanical interactions in testicular descent. **J. Urol.**, v. 127, p. 170-176, 1982.

ELLENPORT, C. R. Aparelho urogenital geral. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 136-139.

EMMEN, J.M.A.; McLUSKEY, A.; ADHAM, I.M. et al. Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen. **Endocrinol.**, v. 141, n. 2, p. 4720-4727, 2000.

EUCLYDES, R.F. **Sistema de análise estatística e genética (SAEG)**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 62 p.

EVANS, A.C.O.; DAVIES, F.J.; NASSER, L.F. et al. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. **Theriog.**, v. 43, p. 569-578, 1995.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1996. 785 p.

FENTENER van VLISSINGEN, J.M.; ZOELLEN, E.J.J. van; URSEM, P.J.F. et al. In vitro model of the first phase of testicular descent: identification of a low molecular weight factor from fetal testis involved in proliferation of gubernaculum testis cells and distinct from specified polypeptide growth factors and fetal gonadal hormones. **Endocrinol.**, v. 123, n. 6, p. 2868-2877, 1988.

FREY, H.L.; RAJFER, J. Role of gubernaculum and intrabdominal pressure in the process of testicular descent. **J. Urol.**, v. 131, p. 574-579, 1984.

GIER, H. T.; MARRION, G. B. Development of mammalian testes and genital ducts. **Biol. Reprod. (Suppl.)**, v. 1, p. 1-23, 1969.

GROCOCK, C.A.; CHARLTON, H.M.; PIKE, M.C. Role of fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice. **J. Reprod. Fertil.**, v. 83, p. 295-300, 1988.

GÜNZEL-APEL, A.R.; HILLE, P.; HOPPEN, H.-O. Spontaneous and GnRh-induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal, adult and aging male Beagles. **Theriog.**, v. 41, p. 737-745, 1994.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582 p.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **J. Roy. Microsc. Soc.**, v. 76, p. 84-97, 1957.

HEYNS, C.F.; De KLERK, D.P. The gubernaculum during descent in the pig fetus. **J. Urol.**, v. 133, p. 694-699, 1985.

HEYNS, C.F.; HUMAN, H.J.; WERELY, C.J. et al. The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. **J. Urol.**, v. 143, p. 612-617, 1990.

HEYNS, C.F.; HUTSON, J.M. Historical review of theories in testicular descent. **J. Urol.**, v. 153, p. 754-767, 1995.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. Prepubertal genital grooming and penile erections in relation to sexual behavior of rats. **Physiol. Behav.**, v. 71, p. 51-56, 2000.

HIORT, O. Androgens and Puberty. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 16, n. 1, p. 31-41, 2002.

HUSMANN, D.A.; LEVY, J.B. Current concepts in the pathophysiology of testicular descent. **Urology**, v. 46, p. 267-276, 1995.

HUTSON, J.M.; WATTS, L.M.; MONTALTO, J.; GRECO, S. Both gonadotropin and testosterone fail to reverse estrogen-induced cryptorchidism in fetal mice: evidence for non-androgenic control of testicular descent in the fetus. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 5, p. 13-18, 1990.

HUTSON, J.M.; HASTHORPE, S.; HEYNS, C.F. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. **Endocr. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 259-280, 1997.

HUTSON, J.M.; WATTS, L.M.; FARMER, P.J. Congenital undescended testes in neonatal pigs and the effect of exogenous calcitonin gene-related peptide. **J. Urol.**, v. 159, n. 3, p. 1025-1028, 1998.

INABA, T.; MATSUOKA, S.; KAWATE, N.; MORI, J. Developmental changes in testicular luteinising hormone receptors and androgens in the dog. **Res. Vet. Sci.**, v. 57, p. 305-309, 1994.

JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. **Vet. Clin. of North Am.: Small Anim Pract.**, v. 21, p. 545-551, 1991.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. 1.ed. Philadelphia: Saunders, 2001.

JOSSO, N.; CATE, R.L.; PICARD, J-Y. et al. Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 49, p. 1-59, 1993.

KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T.; OGASA, A. Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 53, n. 2, p. 241-248, 1991.

KAWAKAMI, E.; YAMADA, Y.; TSUTSUI, T. et al. Changes in plasma androgen levels and testicular histology with descent of the testis in the dog. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 55, n. 6, p. 931-935, 1993.

KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T.; SAITO, S. et al. Changes in peripheral plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations and semen quality in normal and cryptorchid dogs during sexual maturation. **Lab. Anim. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 258-263, 1995.

KERSTEN, W.; MOLENAAR, G.J.; EMMEN, J.M.A. et al. Bilateral cryptorchidism in a dog with persistent cranial testis suspensory ligaments and inverted gubernacula: report of a case with implications for understanding normal and aberrant testis descent. **J. Anat.**, v. 189, p. 171-176, 1996.

KUMI-DIAKA, J.; ADEYANJU, J.B. Histological assessment of puberty in dogs in the Zaria area of Northern Nigeria. **Res. Vet. Sci.**, v. 40, p. 281-284, 1986.

LUNSTRA, D.D.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: acrossome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **J. Anim. Sci.**, v. 55, n. 3, 1982.

McLACHLAN, R. I. The endocrine control of spermatogenesis. **Baillière's Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 14, n. 3, p. 345-362, 2000.

MIALOT, J.P.; GUERIN, Ch.; BEGON, D. Growth, testicular development and sperm output in the dog from birth to post pubertal period. **Androl.**, v. 17, n. 5, p. 450-460, 1985.

MIALOT, J.P.; THIBIER, M.; TOUBLANC, J.E. et al. Plasma concentration of luteinizing hormone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione between birth and one year in the male dog: longitudinal study and hCG stimulation. **Androl.**, v. 20, p. 145-154, 1988.

MOMOSE, Y.; GRIFFITHS, A.L.; HUTSON, J.M. Testicular descent. III. The neonatal gubernaculum shows rhythmic contraction in organ culture in response to calcitonin gene-related peptide. **Endocrinol.**, v. 131, p. 2881-2884, 1992.

MOORE, H.D.M. Localization of specific glycoproteins secreted by rabbit and hamster epididymis. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 705-718, 1980.

OPRINS, A.C.; FENTENER van VLISSINGEN, J.M.; BLANKENSTEIN, M. A. Testicular descent: androgen receptors in cultured porcine gubernaculum cells. **J. Steroid Biochem.**, v. 31, n. 4A, p. 387-391, 1988.

PARK, W-H.; HUTSON, J.M. The gubernaculum shows rhythmic contractility and active movement during testicular descent. **J. Pediatr. Surg.**, v. 26, p. 615-617, 1991.

PATTABIRAMAN, S.R. Overview of andrology in animal reproduction. **Indian J. Anim. Reprod.**, v. 17, n. 2, p. 80-83, 1996.

PAULA, T.A.R.; CARDOSO, F.M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica. **Arq. Bras.Med. Vet. Zoot.**, v. 46, n. 1, p. 19-30, 1994.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **J. Anim. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 99-102, 1975.

RAVASZOVÁ, O.; MESÁROS, P.; LUKÀN, M. et.al. Testicular descent in dogs and therapeutic measures problems of abnormal descending testes. **Folia Vet.**, v. 39, n. 1-2, p. 45-47, 1995.

RENAVILLE, R.; DEVOLDER, A.; MASSART, S. et al. Changes in the hypophysial-gonadal axis during the onset of puberty in young bulls. **J. Reprod. Fert.**, v. 99, p. 443-449, 1993.

RHOADES, J.F.; FOLEY, C.W. Cryptorchidism and intersexuality. **Vet. Clin. North America**, v. 7, p. 789-794, 1977.

ROGOL, A. D. Androgens and puberty. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 198, p. 25-29, 2002.

SCHMIDT-HEBBEL, J.; TONIOLLO, G.H.; LEITE, F.G. et al. Características físicas e morfológicas de sêmen de touros jovens das raças Gir, Guzerá, Nelore (*Bos taurus indicus*) e Caracu (*Bos taurus taurus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 5, 2000.

SEAGER, S.J. Semen collection and evaluation in the dog. In: MORROW, A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals**. Philadelphia: Saunders, 1986. p. 539-541.

SKINNER, J.D.; ROWSON, L.E.A. Puberty in Suffolk and crossbred rams. **J. Reprod. Fertil.**, v. 16, p. 479-488, 1968.

SPENCER, J.R.; TORRADO, T.; SANCHEZ, R.S. et al. Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. **Endocrinol.**, v. 129, p. 741-748, 1991.

SPENCER, B. J.; MAHLER, H. R.; NEWTON, B. W. Lack of feminization of the cremaster nucleus in cryptorchid androgen insensitive rats. **J. Urol.**, v. 152, p. 2280-2286, 1994.

SHONO, T.; RAMM-ANDERSON, S.; GOH, D. W.; HUTSON, J. M. The effect of flutamide on testicular descent in rats by scanning electron microscopy. **J. Pediatr. Surg.**, v. 29, p. 839-844, 1994.

SHONO, T.; RAMM-ANDERSON, S.; GOH, D. W.; HUTSON, J. M. Transabdominal testicular descent is really ovarian ascent. **J. Urol.**, v. 152, p. 781-784, 1995.

STYNE, D.M. Physiology of puberty. **Horm. Res.**, v. 41, (Suppl. 2), p. 3-6, 1994.

TAHA, M.A.; NOAKES, D.E.; ALLEN, W.E. Some aspects of reproductive function in the male beagle at puberty. **J. Small Anim. Pract.**, v. 22, p. 663-667, 1981.

TSUTSUI, T.; TSUJI, J.; KAWAKAMI, E. et al. Peripheral plasma androgen levels in the male dog from birth to sexual maturity. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 49, n. 1, p. 177-179, 1987.

TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E.; MURAO, I. et al. Androgen levels in spermatic venous plasma and peripheral venous plasma of the dog during the process of sexual maturity. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 52, n. 2, p. 431-434, 1990.

URBANSKI, H. F. Leptin and Puberty. **Trends in Endocrinol. Metab.**, v. 12, n. 10, 2001.

van der SCHOOT, P.; ELGER, W.H. Androgen induced prevention of the outgrowth of cranial suspensory ligaments in fetal rats. **J. And.**, v. 13, p. 534-542, 1992.

van der SCHOOT, P. The name cranial ovarian suspensory ligaments in mammalian anatomy should only be used to indicate the structures derived from the foetal cranial mesonephric and gonadal ligaments. **Anat. Rec.**, v. 237, p. 434-438, 1993.

van der SCHOOT, P.; EMMEN, J.M.A. Development, structure and function of the cranial suspensory ligaments of the mammalian gonads in a cross-species perspective; their possible role in effecting disturbed testicular descent. **Hum. Reprod. Update.**, v. 2, n. 5, set./out. 1996.

VISSER, J.H.; HEYNS, C.F. Proliferation of gubernaculum cells induced by a substance of low molecular mass obtained from fetal pig testes. **J. Urol.**, v. 153, p. 516-520, 1995.

VISSER, J.H.; HEYNS, C.F. Luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone during testicular descent in the pig fetus. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 1115-1120, 1996.

WENSING, C.J.G. Testicular descent in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. **Anat. Rec.**, v. 214, p. 154-160, 1986.

WENSING, C.J.G. The embryology of testicular descent. **Horm. Res.**, v. 30, p. 144-150, 1988.

WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Prepubertal behavior and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **J. Anim. Sci.**, v. 24, p. 761-765, 1965.