



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADO À
AGROPECUÁRIA - PPGBAA

ELAINE FERREIRA MESQUITA

ASSOCIAÇÃO DE EXPRESSÕES GÊNICAS LIGADAS À ESPERMATOGÊNESE
COM AS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS TESTICULARES DE
BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)

BELÉM

2021

ELAINE FERREIRA MESQUITA

**ASSOCIAÇÃO DE EXPRESSÕES GÊNICAS LIGADAS À ESPERMATOGÊNESE
COM AS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS TESTICULARES DE
BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.
Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

BELÉM

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M578a Mesquita, Elaine Ferreira
ASSOCIAÇÃO DE EXPRESSÕES GÊNICAS LIGADAS À ESPERMATOGÊNESE COM AS
CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS TESTICULARES DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) /
Elaine Ferreira Mesquita. - 2020.
25 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
(PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2020.
Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho
Coorientador: Profa. Dra. Priscila Di Paula Bessa Santana.

1. Expressão Gênica. 2. Morfometria. 3. RT-PCR. I. Filho, Ednaldo da Silva, *orient.* II. Título

CDD 636.08926

ELAINE FERREIRA MESQUITA

**ASSOCIAÇÃO DE EXPRESSÕES GÊNICAS LIGADAS À ESPERMATOGÊNESE
COM AS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS TESTICULARES DE
BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

14.02.2020

Data da Aprovação

BANCA EXAMINADORA



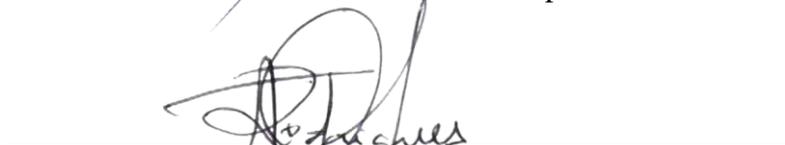
Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho - Presidente (Orientador)
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. Erick Fonseca de Castilho – Membro Externo
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. João Maria do Amaral Júnior- Membro Externo
Instituto Federal do Amapá



Prof^ª. Dr.^a. Angélica Lucia Figueiredo Rodrigues - Membro Externo
Secretaria de Educação do Estado do Pará



Prof. Dr. Sebastião Rolin Filho - Suplente
Universidade Federal Rural da Amazônia

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1. Local e período do experimento	8
2.2. Inspeção pós abate.....	8
2.3. Coleta de amostras dos testículos	9
2.4. Processamento Histológico.....	10
2.4.1. Avaliação Histopatológica e Citologia testicular.....	10
2.3. Metodologias Laboratoriais	10
2.3.1. Extração do Ácido Ribonucleico (RNA)	10
2.3.2. Verificação da qualidade do RNA obtido.....	10
2.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase transcriptase reversa (RT-PCR)	11
2.3.4. Análises Estatísticas	12
3. RESULTADOS	12
3.1. Exame macroscópico	12
3.2. Exame microscópico dos testículos	14
3.3. Expressão Gênica	18
4. DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS	23

RESUMO

ASSOCIAÇÃO DE EXPRESSÕES GÊNICAS LIGADAS À ESPERMATOGÊNESE COM AS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS TESTICULARES DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)

E.F. Mesquita ^a, E.S. Filho ^a, C.L.P. Santos ^a, L.J.A. Paredes ^a.

^a Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

A estrutura populacional dos búfalos no Brasil nos últimos anos vem enfrentando problemas e devido a isso, uma alternativa para os criadores está sendo a introdução de animais novos ao rebanho visando à multiplicação mais rápida desse material genético superior. Entretanto, essa melhora no rebanho bubalino somente será possível se houver conhecimentos fisiológicos e genéticos das relevantes características associadas à eficiência reprodutiva. Nesse sentido o objetivo deste estudo foi avaliar amostras de testículos de búfalos, oriundos dos Estados do Amapá e Pará, obtidos em matadouro frigorífico, organizados de acordo com grupos de idade: 12 a 24 meses, 25 a 30 meses, 31 a 55 meses e maiores de 55 meses. As amostras foram utilizadas para a produção de lâminas de microscópio para o estudo dos achados anatomopatológicos e morfométricos dos túbulos seminíferos, e para análise gênica. A extração do RNA, possibilitou a identificação das expressões dos genes P450scc, 3 β -HSD, P450c17, CYP19A1 (P450arom), STAR, PTGS1 (COX-1) e PTGS2 (COX-2), através do RT-PCR. Dentre os resultados da anatomopatologia foram encontradas: calcificação, degeneração, fibrose, atrofia e orquite. Na morfometria foram contadas as células germinativas: Sertoli, não houve diferença estatística entre os grupos; Espermatócito I e II, havendo diferença estatística entre os grupos das extremidades. Para a expressão dos genes P450scc houve diferença estatística entre as faixas etárias de 12 a 24 meses, 25 a 30 meses e 31 a 55 meses, onde a faixa etária maior de 55 meses apresentou-se estatisticamente igual a 25 a 30 meses e 31 a 55 meses. Quanto ao gene 3 β -HSD houve diferença estatística entre a faixa etária de 12 a 24 meses e para as demais. Os genes P450c17 e STAR não apresentaram diferença estatística entre as faixas etárias. Para o gene CYP19A1 (P450arom) houve somente diferença estatística na faixa etária 31 a 55 meses. Enquanto para os genes PTGS1(COX-1) e PTGS2 (COX-2) houve diferença estatística entre as faixas etárias 25 a 30 meses e 31 a 55 meses. Estes achados sugerem que esses fatores estão relacionados a mudanças na capacidade de sintetizar esteroides nos testículos bubalinos durante a puberdade e o envelhecimento. Este trabalho poderá ser complementado com experimentos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: Expressão Gênica, Morfometria, RT-PCR.

ABSTRACT

ASSOCIATION OF GENE EXPRESSIONS LINKED TO SPERMATOGENESIS WITH THE TESTICULAR ANATOMOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BUFFALOS (*Bubalus bubalis*)

E.F. Mesquita ^a, E.S. Filho ^a, C.L.P. Santos ^a, L.J.A. Paredes ^a.

^a Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

The population structure of buffaloes in Brazil in recent years has been facing problems and because of this, an alternative for breeders is the introduction of new animals to the herd aiming at the faster multiplication of this superior genetic material. However, this improvement in the buffalo herd will only be possible if there is physiological and genetic knowledge of the relevant characteristics associated with reproductive efficiency. In this sense, the objective of this study was to evaluate samples of buffalo testicles, coming from the States of Amapá and Pará, obtained in a slaughterhouse, organized according to age groups: 12 to 24 months, 25 to 30 months, 31 to 55 months and older than 55 months. The samples were used to produce microscope slides for the study of anatomopathological and morphometric findings of seminiferous tubules, and for gene analysis. RNA extraction enabled the identification of P450scc, 3 β -HSD, P450c17, CYP19A1 (P450arom), STAR, PTGS1 (COX-1) and PTGS2 (COX-2) genes, through RT-PCR. Among the results of anatomopathology were found: calcification, degeneration, fibrosis, atrophy and orchitis. Germ cells were counted in the morphometry: Sertoli, there was no statistical difference between the groups; Spermatocyte I and II, with statistical difference between the extremity groups. For the expression of P450scc genes, there was a statistical difference between the age groups of 12 to 24 months, 25 to 30 months and 31 to 55 months, where the age group older than 55 months was statistically equal to 25 to 30 months and 31 to 55 months. As for the 3 β -HSD gene, there was a statistical difference between the age range of 12 to 24 months and for the others. The P450c17 and STAR genes showed no statistical difference between the age groups. For the CYP19A1 gene (P450arom) there was only a statistical difference in the age group 31 to 55 months. While for the PTGS1 (COX-1) and PTGS2 (COX-2) genes, there was a statistical difference between the age groups 25 to 30 months and 31 to 55 months. These findings suggest that these factors are related to changes in the ability to synthesize steroids in the buffalo testicles during puberty and aging. This work can be complemented with future experiments.

Keywords: Gene Expression, Morphometry, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro bubalino está estimado em aproximadamente 1,37 milhão de cabeças e os mesmos se distribuem pelas cinco regiões do Brasil nas seguintes proporções: Norte (66,2%), Nordeste (9,5%), Sudeste (12,7%), Sul (7,4%) e Centro-Oeste (4,4%). O Pará é detentor de 37,9% de todo o efetivo do País, e o Amapá com 21,6%, ou seja, juntos são 89,9% do rebanho da Região Norte, e 59,5% do rebanho nacional. Em termos municipais, os dez municípios com os maiores efetivos: seis estão no Pará e quatro no Amapá. O Município de Chaves/PA, com 160,85 mil animais na primeira posição; seguido por Cutias/AP e Soure/ PA [1].

A importância econômica do emprego desses animais na produção animal versa também nas qualidades como: fertilidade, longevidade, eficiência de conversão alimentar e aptidão para produção de leite, carne e trabalho [2].

Apesar das qualidades citadas anteriormente, os búfalos apresentam alguns problemas como baixa fertilidade ou infertilidade. Estes impasses em touros sendo eles bovinos ou bubalinos são consequências de fatores ambientais desfavoráveis, seja o manejo incorreto, a origem genética ou, principalmente, a origem infecciosa, a exemplo: degeneração testicular, maturidade sexual retardada, hipoplasia testicular, espermiogênese imperfeita e imaturidade sexual [3, 4, 5].

Como a seleção genética do touro bubalino exige considerações importantes devido ao prejuízo que os defeitos genéticos ocasionam de forma incontrolada dentro rebanho, juntamente com patologias extragenitais e genitais [6]. A análise precisa do RNA pode prover informações importantes sobre expressão de genes relacionados a processos de fertilidade dos búfalos. E para que isto seja possível, é necessário que seja feito uma extração eficaz do RNA, conservando sua integridade e qualidade [7].

Na busca dessa seleção, nos últimos anos estão sendo utilizadas técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a mesma vem sendo bastante utilizada para diagnóstico em fluidos e órgãos de várias espécies animais. A amplificação "in vitro" dos ácidos nucleicos, através do PCR permite a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA. Devido à alta sensibilidade, especificidade e rapidez, o método oferece vantagens sobre os testes convencionais de diagnóstico [8].

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar testículos obtidos de matadouro frigorífico, relacionando os achados anatomopatológicos, morfométricos dos túbulos seminíferos com a

identificação das expressões dos genes P450scc, 3 β -HSD, P450c17, CYP19A1 (P450arom), STAR, PTGS1(COX-1) e PTGS2 (COX-2), através do PCR em tempo real (RT-PCR) ligados a espermatogênese nas amostras de testículo de búfalos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e período do experimento

Foram coletados testículos de búfalos, no período de abril de 2019, oriundos de frigorífico particular, com serviço de inspeção estadual, do Estado do Amapá, localizado em Santana (Longitude 0°02'06" S Latitude 51°10'30" O). Os animais abatidos eram procedentes de propriedades nos municípios do interior do Estado do Amapá (Tartarugalzinho: Longitude 1° 30' 21" N Latitude 50° 54' 43" O; Itaubau: Longitude 0° 35' 45" N Latitude 50° 40' 15" E; Cutias: Longitude 0° 59' 09" N Latitude 50° 48' 07" O; Vitoria do Jari: Longitude 0° 56' 16" S Latitude 52° 25' 26" O) e alguns Municípios da Ilha do Marajó, além da região do Baixo Amazonas, do estado do Pará (Almerim: Longitude 1° 31' 22" S Latitude 52° 34' 55" O; Monte Alegre: Longitude 2° 0' 28' S Latitude 54° 04' 08" O; Chaves: Longitude 0° 09' 36" S Latitude 49° 59' 16" O), onde eram submetidos à sistema de criação extensivo.

Os 33 pares de testículos bubalinos obtidos, foram avaliados por meio de exame macroscópico sendo examinados individualmente, por inspeção e palpação. As idades dos machos bubalinos foram determinadas a partir da avaliação da dentição, por isso, os animais foram separados em 4 grupos de acordo com a idade: 12-24 meses; 25-30 meses; 31-55 meses e maiores que 55 meses [9].

Os dados dos animais foram registrados em planilhas impressas quanto à idade e local de origem do animal (Anexo I).

2.2. Inspeção pós abate

A avaliação "*post mortem*" ocorreu após as etapas de insensibilização, sangria, esfolagem e evisceração, preconizadas no Decreto nº 9.013/2017 - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA - 2017), de responsabilidade do Serviço de Inspeção Estadual (SIE). Em seguida os testículos foram submetidos à mensuração, com auxílio de um paquímetro e fita métrica, obtendo-se os valores referentes ao comprimento e perímetro escrotal e testicular. Os sistemas reprodutores que apresentaram alterações anatomopatológicas identificadas pelo exame macroscópico foram documentados por meio de fotografia.

2.3. Coleta de amostras dos testículos

Dentre os órgãos que apresentaram alterações anatomopatológicas de origem adquirida e/ou genética, procedeu-se a coleta de 02 (duas) amostras de cada lesão/órgão para posteriores exames: 1) Histopatológico, onde as amostras foram acondicionadas em solução de formol salino tamponado a 10%, e 2) PCR, onde as amostras foram acondicionadas em RNA *later*, identificadas individualmente e mantidas à -20 °C, até o transporte ao laboratório. E mantidos á -80 °C, até o processamento no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém.

O perímetro escrotal (PE) foi conferido utilizando uma fita métrica flexível, posicionando na mediana do escroto, no ponto de maior tamanho horizontal, abrangendo as duas gônadas e a pele escrotal. Utilizando o paquímetro, foi aferido o comprimento testicular (COMP), excluindo a cabeça e cauda do epidídimo.

Outros dados da biometria testicular foram coletados por meio do uso de um paquímetro para a aferição das medidas de comprimento e largura, medida mensurada na porção dorso ventral de cada testículo, o comprimento (C) aferido do ápice à base de cada testículo, desprezando a cabeça e cauda do epidídimo. O diâmetro, largura ou espessura dos testículos (L) foi aferido a maior distância no sentido craniocaudal de cada testículo,

Para calcular o volume testicular (VT) foi adotada a seguinte fórmula [9]:

$$Vol. = 2 [(r^2) * \pi * h], \text{ em que:}$$

r = raio da largura testicular (L/2);

$\pi = 3,1416$;

h = comprimento testicular.

De acordo com a equação, o volume é expresso em cm³ e correspondem os dois testículos somados. A forma dos testículos foi determinada pela razão matemática entre o diâmetro e comprimento (LARG/COMP), o qual apresenta uma escala de 0,5 a 1, onde 0,5 significa LARG = ½ COMP e 1 significa LARG = COMP [10]. Em função desta escala, foram estabelecidas as seguintes formas testiculares:

- Razão $\leq 0,5$ = longo;
- Razão entre 0,51 e 0,625 = longo/moderado;
- Razão entre 0,626 e 0,750 = longo/oval;
- Razão entre 0,751 e 0,875 = oval/esférico;
- Razão $> 0,875$ = esférico.

2.4. Processamento Histológico

Utilizando lâmina de bisturi de primeiro uso, para não haver contaminação, os testículos foram seccionados no sentido latero-medial, as amostras de tecidos coletadas foram de no máximo 0,6 cm de espessura, armazenadas em frasco de vidro de boca larga com formol salino tamponado a 10%, por 24–48 h para fixação, em seguida o volume do fixador foi reduzido para transporte até o Laboratório do Centro Nacional de Primatas (Rod. Bernardo Sayão, 1110 - Águas Lindas, Ananindeua - PA, 67000-000). As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico, sob aumento de 10X e 40X.

Fragmentos da porção média de cada testículo, foram obtidos no sentido de submetê-los a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo a 5 µm. Os cortes obtidos em lâminas histológicas foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina-HE [11], realizando-se as leituras das lâminas em microscópio óptico (NIKON ECLIPSE C1) para a análise morfométrica.

2.4.1. Avaliação Histopatológica e Citologia testicular

As lâminas foram avaliadas ao microscópio, num aumento de no mínimo de 40X, para as contagens dos tipos celulares (espermátócito I, espermátócito II e células de Sertoli) de acordo com a morfologia, realizando a medição de comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos, foram utilizadas lâminas de 5 animais, para cada faixa etária e em seguida foram realizadas as leituras de 20 campos/lâmina em sentido de zig-zag.

Quanto à avaliação histopatológica, a mesma foi realizada nos 33 animais e um aumento de no mínimo de 10X. Todas as lâminas dessa avaliação também foram lidas em sentido zig-zag em todos os campos.

2.3. Metodologias Laboratoriais

2.3.1. Extração do Ácido Ribonucleico (RNA)

A extração de RNA total foi feita a partir de 300 µL de tecido das amostras de tecido dos testículos utilizando o reagente TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.3.2. Verificação da qualidade do RNA obtido

Após as extrações, as amostras de RNA foram submetidas ao espectrofotômetro UV-Vis BioDrop Touch Duo™ para a verificação de sua pureza, a qual é determinada pelas razões A260 / 280 e A260 / 230. A pureza do RNA foi avaliada pela relação da absorção a um

comprimento de onda de 260 nm a que a 280 nm; os valores foram superiores a 1,5 em todas as amostras.

2.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase transcriptase reversa (RT-PCR)

Todos os RT-PCR foram realizados em triplicata para os genes relacionados à espermatogênese os quais são: P450scc, 3 β -HSD, P450c17, CYP19A1 (P450arom), STAR, PTGS1 (COX 1) e PTGS2 (COX 2) e GAPDH gene endógeno para a espécie bubalina, usando *PowerGreen Sybr*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, com um volume final de 20 μ L. Todas as reações foram realizadas usando o Sistema de Detecção em Tempo Real CFX96 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

As condições de RT-PCR foram de 15 minutos a 48°C para produção de cDNA, 15 minutos a 95° C para desnaturação, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, 1 minuto a 60° C para amplificação do DNA, e para curva de Melt, 05 segundos aumenta 0.5°C/ciclo, 65°C a 95°C. Os níveis de mRNA nas amostras foram calculados com os valores do ciclo de limiar de mRNA alvo para cada amostra divididos pelos valores do GAPDH, que serviu como controle endógeno para gerar Cqs dos genes alvo. Os valores médios das determinações duplicadas foram utilizados para análises estatísticas. Os *Primers* utilizados foram desenhados através do programa *Primers3* (<http://simgene.com/Primer3>) e estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Genes e sequência dos *primers* para a espécie bubalina.

Nome	Sequência de iniciador (5' - 3')	Tamanho (pb)	Referência
P450scc	F:GTCCTGAACACGGAGGTGAT R:AGGCTGACGAAGTCCTGAGA	86	ID:102400151
3 β -HSD	F:GCTGGAAGGAGACATTCTGG R:GTCTCTCGTGGGACAGCATT	114	ID:102413429
P450c17	F:TCTGTCCGAGCCTCTCTCTC R:AGGGCAGGATCCTCATTCTT	87	ID:102412624
P450arom (CYP19A1).	F:CGCAAAGCCTTAGAGGATGA R:TAGGCTTTGGGAAAACTCG	109	ID:102392019
STAR	F:GGTCCTGCAGAAAATTGGAA R:CGTACGCTCACAAAGTCTCG	99	ID:102410810
PTGS1(COX1)	F:TCCTGTGCTGATGCACTACC R:GAAGCAGCCCAAACACCTC	80	ID:102395640
PTGS2(COX2)	F:TGATGATGTACGCCACCATT R:TCTGGAACAACACTGCTCATCG	99	ID:102416528
GAPDH	F:ACCCAGAAGACGGTGGATG R:CCGTTGAGCTCAGGGATGA		

2.3.4. Análises Estatísticas

Após a coleta de dados, os mesmos foram alocados em planilhas e submetidos ao *PROC FREQ* do programa SAS 9.0, para formulação do banco de dados. Evidenciando a associações dos dados coletados com os resultados dos diagnósticos histopatológicos, contagem de células, PCR e macroscópico pelo teste qui-quadrado. O nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

Bem como foi realiza estatística descritiva para todas as variáveis estudadas (biometrias e patologias testiculares), registrando-se as médias, os desvios padrões e a distribuição de frequências para as características de classes andrológicas.

Os dados quantitativos referentes às idades dos touros e biometrias testiculares foram submetidos à ANOVA e quando houve efeito significativo pelo teste F, às médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* a 5 % de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS

3.1. Exame macroscópico

A partir dos dados das Guias de Trânsito Animal (GTA's), foi determinada qual a origem dos animais. De um total 33 sistemas genitais examinados, 12 (36,36%) eram oriundos de criações de propriedades do estado Pará, e 21 (63,63%) de propriedades do estado do Amapá.

Para uma melhor análise os animais foram classificados de acordo com a idade [9], a tabela 2, demonstra a ocorrência de acordo com a faixa etária onde, foi verificado que as maiores percentagens de búfalos estavam nas faixas etárias > 55 meses (39,4%) e 12 a 24 meses (30,3%), respectivamente.

Tabela 2 - Valores absolutos e percentuais de testículos bubalinos examinados, de acordo com a faixa etária, no Pa/Ap.

Faixa Etária	Total
12 - 24 meses	10 (30,3%)
25 - 30 meses	5 (15,15%)
31 - 55 meses	5 (15,15%)
>55 meses	13 (39,4%)
Total	33 (100%)

Na tabela 3, estão demonstrados os resultados das avaliações do Perímetro Escrotal (PE) sendo observado que a maior e menor média ocorreram na faixa etária > 55 meses e 12 a 24 meses, respectivamente. Havendo diferença estatística somente entre a faixa etária > 55 meses em relação às demais.

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão do perímetro escrotal de acordo com a faixa etária de bubalinos examinados.

Média e Desvio Padrão.	
12 a 24 meses	24,48 ^b ± 1,44 cm
25 a 30 meses	26,06 ^b ± 3,74 cm
31 a 55 meses	28,38 ^b ± 2,41 cm
> 55 meses	31,86 ^a ± 3,60 cm

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

Na tabela 4, encontram-se os dados de média e desvio padrão da análise do volume testicular geral, direito e esquerdo, respectivamente. A maior média geral (694,97 cm³) foi verificada no grupo etário > 55 meses, assim como as médias do testículo direito (877,21 cm³) e esquerdo (512,72 cm³), respectivamente. Sendo estas diferentes estatisticamente das demais. O grupo etário de 12 a 24 meses apresentou a menor média do volume testicular geral.

Tabela 4 - Média e desvio padrão do volume testicular geral, direito e esquerdo de bubalinos referente à faixa etária.

	12 a 24 meses		25 a 30 meses		31 a 55 meses		> 55 meses	
	Média	Desv. Pad.	Média	Desv. Pad.	Média	Desv. Pad.	Média	Desv. Pad.
Geral	281,68 ^b cm ³	117 cm ³	311,88 ^b cm ³	119,27 cm ³	401,86 ^b cm ³	116,82 cm ³	694,97 ^a cm ³	269,56 cm ³
Dir.	384,05 ^b cm ³	180,48 cm ³	401,40 ^b cm ³	157,49 cm ³	513,04 ^{ab} cm ³	183,58 cm ³	877,21 ^a cm ³	354,50 cm ³
Esq.	179,30 ^b cm ³	55,87 cm ³	222,36 ^b cm ³	84,91 cm ³	290,68 ^b cm ³	51,28 cm ³	512,72 ^a cm ³	204,16 cm ³

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

Na tabela 5, é demonstrado à divisão dentro das faixas etárias, O formato longo/moderado é encontrado 100% na faixa etária de 25 a 30 meses e de 31 a 55 meses, os formatos longo/moderado e longo são 50% cada, dentro da faixa etária 12 a 24 meses, nos > 55 meses, aparecem as três formas, longo (7,69%), longo/oval (15,38%) e com maior prevalência, longo/moderado (76,92%).

Tabela 5 - Percentagem do formato de testículos, de acordo com a faixa etária.

	12 a 24 meses	25 a 30 meses	31 a 55 meses	> 55 meses
Longo/moderado	50%	100%	100%	76,92%
Longo	50%	0	0	7,69%
Longo/oval	0	0	0	15,38%

Os achados da inspeção macroscópica e avaliação das lâminas para microscopia ótica mostrou que as prevalências de alterações testiculares macro foram de 24 casos, que corresponde a 72,72% dos 33 búfalos estudados, e de alterações micro, um total de 93,94% dos búfalos estudados. As patologias foram encontradas em todas as faixas etárias.

A partir da análise das lâminas foram encontradas muitas alterações sendo estes exclusivamente processos patológicos crônicos, os quais estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores Absolutos e Porcentagens dos achados macro e microscópicos dos testículos de Búfalos examinados.

IDADE	QTDE	ANÁLISE MACRO			ANÁLISE MICRO		
		CARACTERÍSTICA	QTDE	%	CARACTERÍSTICA	QTDE	%
12 a 24 meses	10	Aderência	3	30,00	Fibrose	1	33,33
					Atrofia	1	33,33
					Calcificação	1	33,33
					Sem anomalia	1	33,33
		Normal	7	70,00	Fibrose	4	57,14
					Atrofia	5	71,43
					Degeneração	2	28,57
					Orquite	2	28,57
Sem anomalia	2	28,57					
25 a 30 meses	5	Aderência	4	80,00	Fibrose	4	100,00
					Atrofia	2	50,00
					Degeneração	3	75,00
					Orquite	3	75,00
					Calcificação	3	75,00
					Sem anomalia	1	25,00
		Normal	1	20,00	Fibrose	1	100,00
					Calcificação	1	100,00
31 a 55 meses	5	Aderência	5	100,00	Fibrose	4	80,00
					Atrofia	5	100,00
					Degeneração	4	80,00
					Orquite	4	80,00
					Calcificação	1	20,00
> 55 meses	13	Aderência	12	92,31	Fibrose	11	91,67
					Atrofia	3	25,00
					Degeneração	6	50,00
					Orquite	5	41,67
					Calcificação	8	66,67
		Normal	1	7,69	Calcificação	1	100,00

Foi observado também que não houve diferença estatística entre as faixas etárias, quanto à quantidade de células de Sertoli, porém para os tipos celulares espermatócito I e II foi verificada diferença estatística entre as faixas etárias 12 a 24 meses e maiores de 55 meses.

3.2. Exame microscópico dos testículos

Foi verificado que houve variação da evolução dos tipos celulares de acordo com as faixas etárias, em que apenas no grupo maior de 55 meses os espermatócito II são maiores. Ao analisar dentro dos grupos etários a evolução da quantidade dos tipos celulares, as células de Sertoli mantiveram patamar igual em todas as faixas etárias. O espermatócito I apresentou

um leve crescimento, e o espermatozóide II nas faixas etárias de 12 a 24 meses, 25 a 30 meses e de 31 a 55 meses, diminuíram em relação ao espermatozóide I. Esses resultados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Média, Desvio Padrão, Valores máximos e mínimos dos tipos de células do túbulo seminífero de testículo bubalino examinados, de acordo com a faixa etária.

	Sertoli				Espermatozóide I				Espermatozóide II			
	Méd.	Desv.	Máx.	Mín.	Méd.	Desv.	Máx.	Mín.	Méd.	Desv.	Máx.	Mín.
12 a 24	17,19 ^a	4,58	36	8	34,15 ^a	9,38	68	9	28,38 ^a	15,75	83	0
25 a 30	14,82 ^a	4,45	34	7	47,22 ^{ab}	12,67	109	18	37,15 ^{ab}	17,94	115	0
31 a 55	15,46 ^a	3,58	29	6	46,43 ^{ab}	6,07	109	13	36,69 ^{ab}	17,47	106	0
>55	19,79 ^a	4,80	37	8	67,57 ^b	18,54	556	27	60,26 ^b	22,40	165	5

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

As mensurações do perímetro dos túbulos seminíferos encontram-se na Tabela 8, onde foi verificada diferença estatística nas faixas etárias de 12 a 24 meses, 24 a 30 meses e > 55 meses e uma igualdade estatística da faixa etária de 31 a 55 meses com as demais.

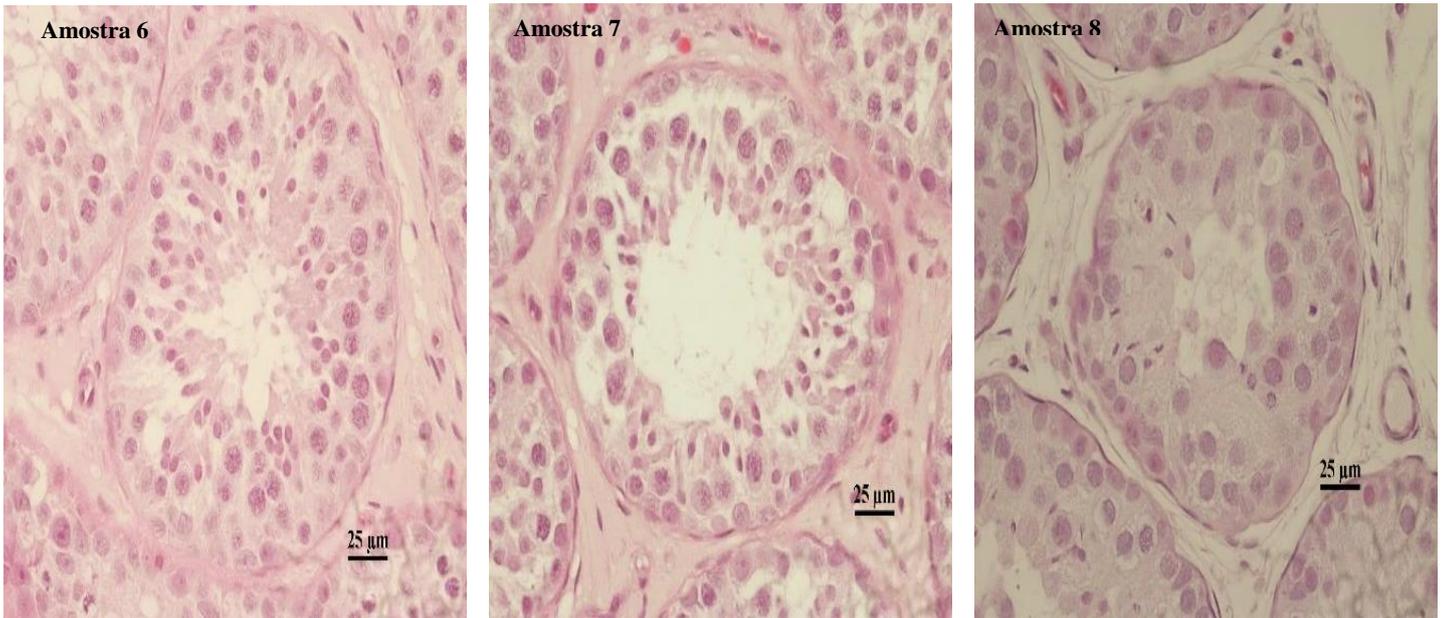
Tabela 8 - Média, Desvio Padrão, Valores máximos e mínimos dos perímetros dos Túbulos seminíferos em testículo bubalino examinado, de acordo com a faixa etária.

	Média	Desv. Pad	Mín	Max
12 a 24 meses	178,66 ^a μm	17,03 μm	124,14 μm	245,06 μm
25 a 30 meses	207,25 ^b μm	6,41 μm	164,78 μm	298,26 μm
31 a 55 meses	207,91 ^{ab} μm	12,15 μm	162,58 μm	267,23 μm
> 55 meses	232,36 ^b μm	17,94 μm	167,40 μm	321,52 μm

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

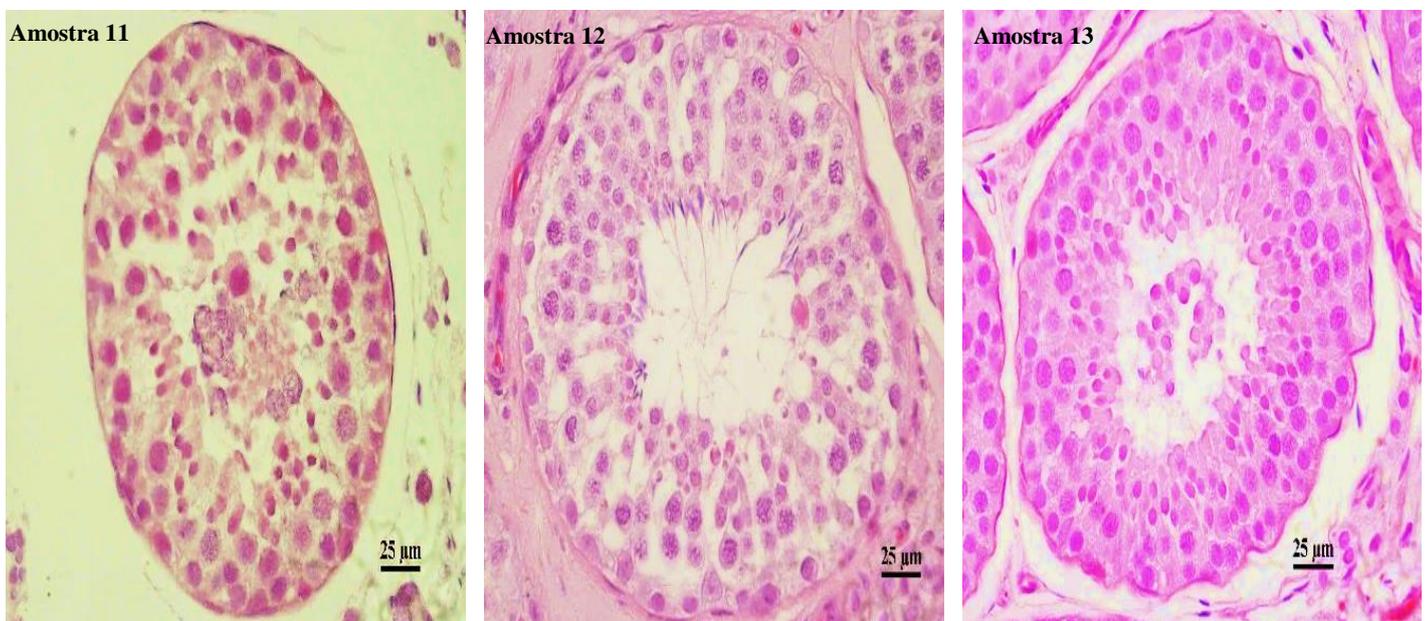
Foi também observado, em todas as faixas etárias, atrofia tubular, formação de vacúolos nas regiões do epitélio seminífero e desprendimento de células para o lúmen. Apesar da formação de depleção, a presença de espermatozóides ainda pode ser detectada em algumas regiões do epitélio (Figuras 1, 2,3 e 4).

Figura 1 - Faixa etária 12 a 24 meses – amostras 6, 7 e 8.



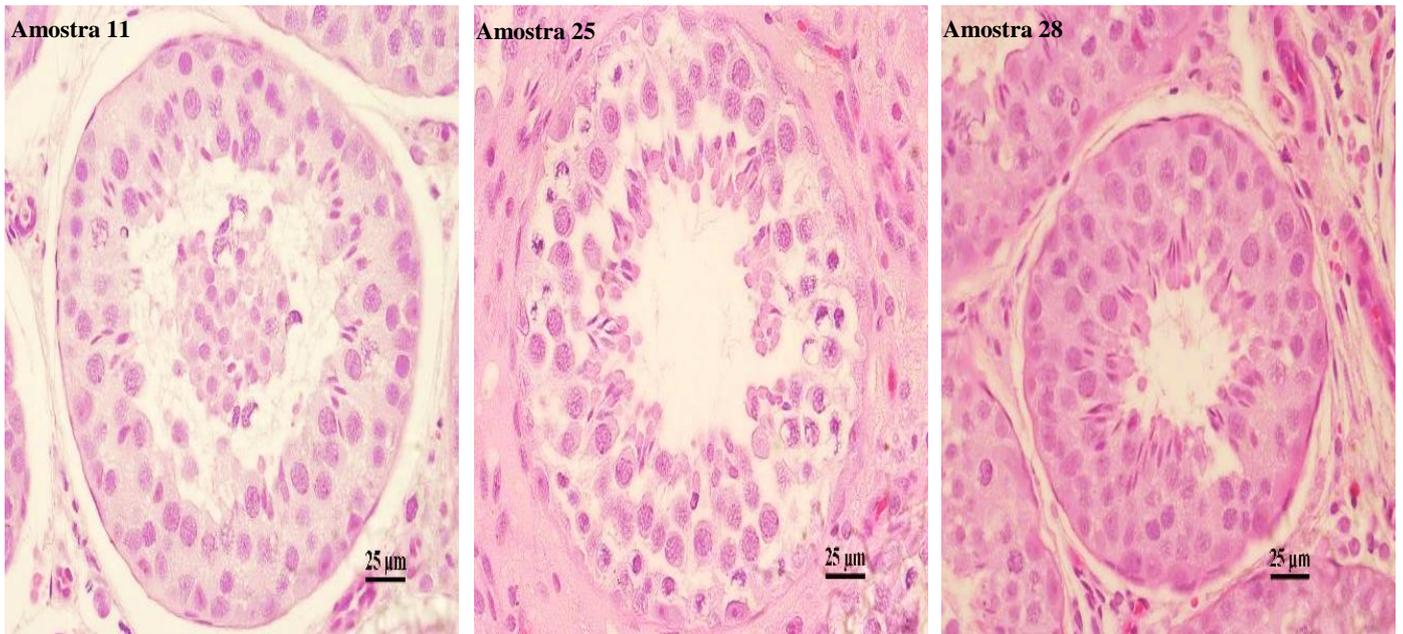
Observa-se vacúolos nas regiões periféricas do epitélio seminífero, não se observa espermatozoides.
 Fonte: Mesquita, E. F., 2020.

Figura 2 - Faixa etária 25 a 30 meses - amostras 11, 12 e 13.



Observa-se desprendimento de células para o lúmen do tubo seminífero e depleção nas regiões periféricas, não se observa espermatozoides.
 Fonte: Mesquita, E. F., 2020.

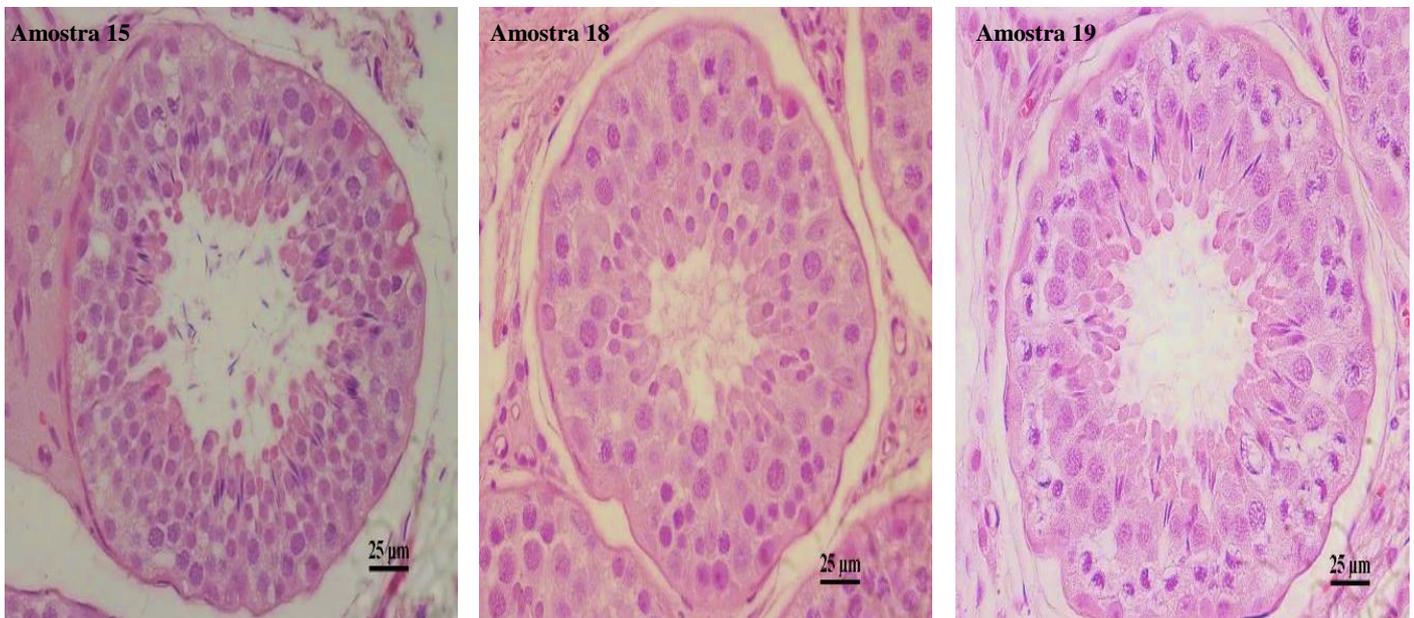
Figura 3 - Faixa etária 31 a 55 meses - amostras 11, 25 e 28.



Observa-se desprendimento de células para o lúmen do tubo seminífero, apesar das depleções nas regiões periféricas observa-se espermatozoides.

Fonte: Mesquita, E. F., 2020.

Figura 4 - Faixa etária maior de 55 meses - amostras 15, 18 e 19.



Observa-se desprendimento de células para o lúmen do tubo seminífero, apesar das depleções nas regiões periféricas observa-se espermatozoides.

Fonte: Mesquita, E. F., 2020.

3.3. Expressão Gênica

Os níveis de expressão gênica dos RNAm testiculares estão descritos nos seguintes gráficos:

Gráfico 1 - Expressão de STAR de acordo com os grupos etários.

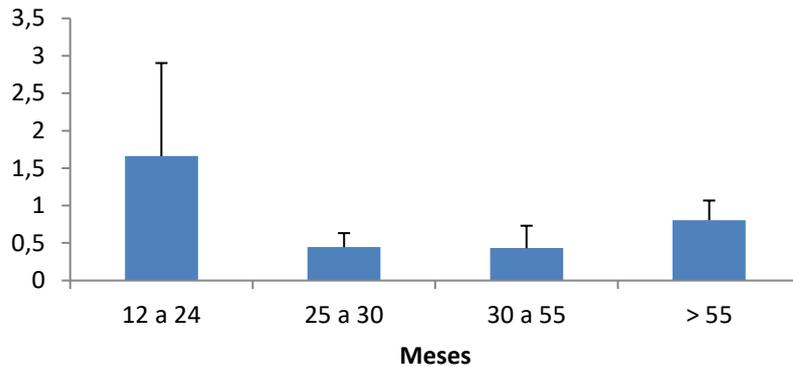


Gráfico 2 - Expressão de P450scc de acordo com os grupos etários.

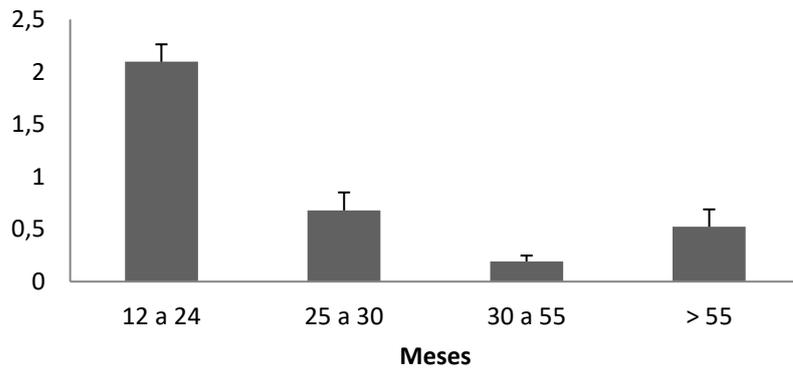


Gráfico 3 - Expressão de 3β -HSD de acordo com os grupos etários.

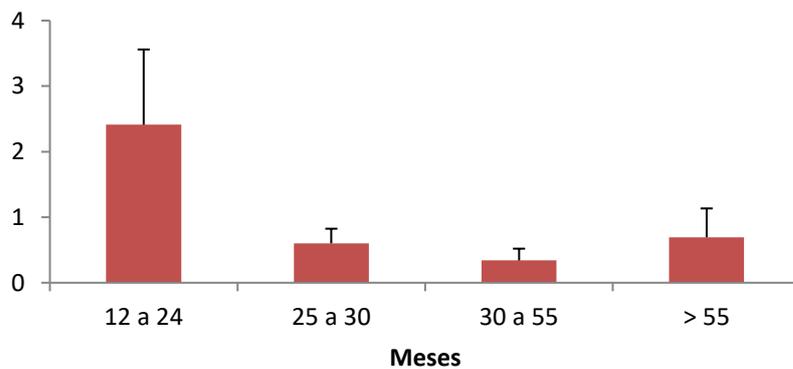


Gráfico 4 - Expressão de P450c17 de acordo com os grupos etários.

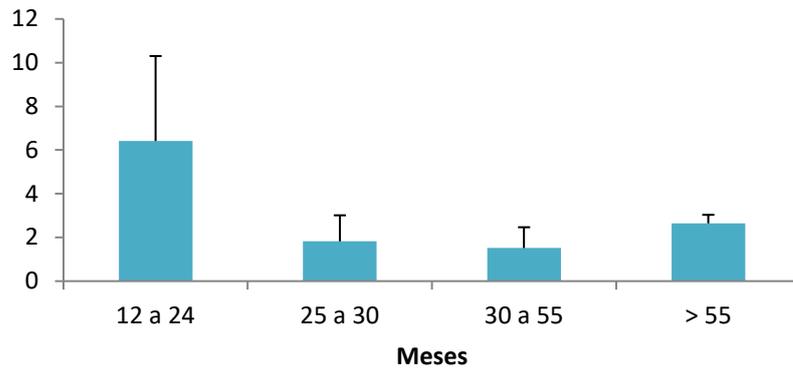


Gráfico 5 - Expressão de CYP19A1 de acordo com os grupos etários.

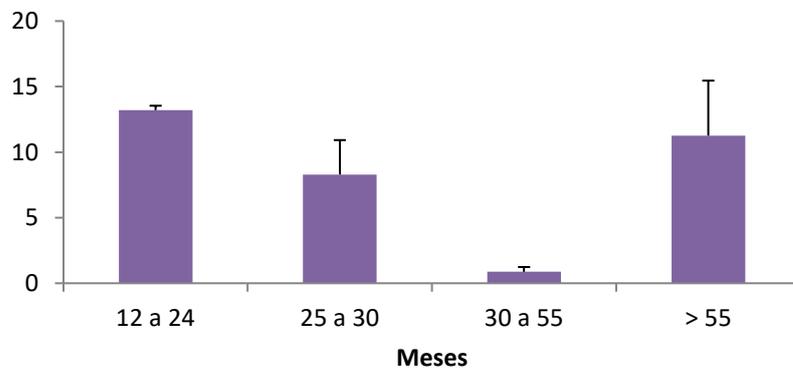


Gráfico 6 - Expressão de PTGS1 de acordo com os grupos etários.

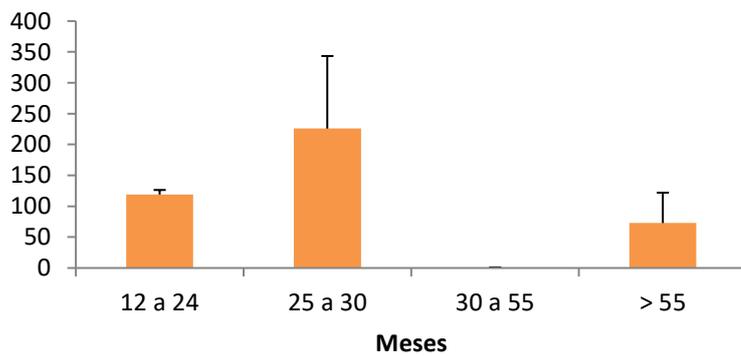
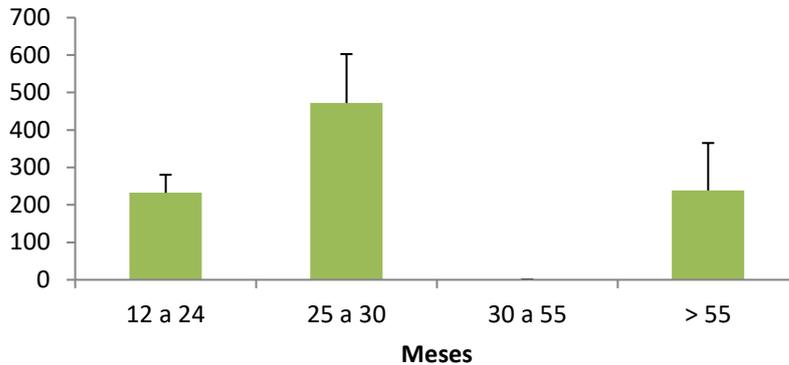


Gráfico 7 - Expressão de PTGS2 de acordo com os grupos etários.



O gene P450scc apresentou diferença estatística entre as faixas etárias de 12 a 24 meses, 25 a 30 meses e 31 a 55 meses, sendo que a faixa etária maior de 55 meses foi estatisticamente igual a 25 a 30 meses e 31 a 55 meses. Quanto ao gene 3β -HSD há diferença estatística entre a faixa etária de 12 a 24 meses e as demais idades.

No entanto para os genes P450c17 e STAR não houve diferença estatística entre as faixas etárias. Para o gene CYP19A1 (P450arom) houve diferença estatística da faixa etária 31 a 55 meses com as demais idades. Enquanto que para os genes PTGS1(COX-1) e PTGS2 (COX-2) existiu diferença estatística entre as faixas etárias 25 a 30 meses e 31 a 55 meses, sendo que as demais idades não possuem diferença estatística.

4. DISCUSSÃO

O perímetro escrotal para reprodutores com idade entre 18-24 meses é de $28,2 \pm 1,6$ cm [12], o que difere do presente estudo, já para os > 36 meses é $32,7 \pm 2,7$ cm, o que não difere muito dos resultados encontrados no presente estudo ao fazer comparação com a idade maior que 55 meses, com média de $31,86 \pm 3,6$ cm.

Os volumes testiculares médios aos 12 meses com $244,45 \text{ cm}^3$, aos 18 meses com $598,60 \text{ cm}^3$ e 24 meses com $1162,68 \text{ cm}^3$ foi constatado [13], e os mesmos apresentam diferença em relação aos valores obtidos no presente estudo. Somente houve aproximação para grupo de 12 a 24 meses. Os resultados de volume médios testiculares obtidos no presente estudo foram maiores aos encontrados em búfalos do pântano [14], porém menores aos mensurados em mestiços Murrah x Jafarabadi com 12, 18 e 24 meses de idade [15].

Ao analisar os volumes dos testículos quanto a direito e esquerdo, observou-se no presente estudo que os testículos direitos são os que têm as maiores médias de volume em todas as idades. Tomando prova desse resultado, sobre a vascularização em testículos de búfalos, os estudos mostram que não há diferença estatística na quantidade de vasos para testículo esquerdo ou direito [16].

Das cinco formas de testículos descritas, foram observadas apenas três nos animais deste estudo. A forma dominante para todos os grupos foi o testículo longo/moderado, com convergência a se virarem de longo/moderado a oval/esférico com o avançar da idade. Esses resultados concordam com o estudo que avaliou touros Nelore, onde o mesmo observou predominância dos testículos longos e uma tendência a se tornarem mais ovais nos animais mais velhos [9]. Esse fato pode ser explicado pelo maior crescimento do comprimento testicular em relação ao diâmetro testicular durante a pré-puberdade, fase que coincide com o aumento da secreção basal de testosterona [17].

As características reprodutivas puberdade e maturidade sexual em bubalinos criados na Amazônia perpassam por dois problemas que são a consanguinidade elevada, aliada a falta de controle zootécnico. Esses problemas são fatores limitantes nos rebanhos da Ilha de Marajó e das regiões do Médio e Baixo Amazonas, pois acabam fazendo que essas características ruins perdurem no rebanho, provocando a puberdade e maturidade tardia e conseqüentemente demora no ganho de peso [18].

Devido isso, o planejamento de reprodução é de suma importância, pois com a inserção e utilização de técnicas moleculares capazes de trazer esse ganho genético aliado aos outros manejos essenciais de uma cadeia produtiva como: nutrição, sanidade e ambiência o rebanho poderá apresentar o chamado melhoramento e conseqüentemente poderá aumentar sua produtividade.

O rendimento da espermatogênese é um indicativo importante da capacidade de produção espermática e pode servir como parâmetro na determinação da idade ideal para a entrada em serviços de reprodutores. No entanto, as degenerações das células germinativas apresentam o maior impacto durante a espermatocitogênese e a meiose. Essas perdas celulares aliadas a fatores tais como desenvolvimento puberal, idade e estação do ano, influenciam diretamente na eficiência do processo espermatogênico [19].

O crescimento do perímetro do túbulo seminífero demonstrou que há evolução das células germinativas, garantindo que a espermatogênese está ocorrendo.

Túbulos seminíferos em búfalos de 12 a 24 meses de idade são menores que em búfalos de 25 a 30 meses de idade, esses dados sugerem que a proporção de células de Leydig para todas as células testiculares em búfalos púberes é maior do que em búfalos pós-púberes. Em consequência, estes resultados sugerem que um aumento na expressão dos genes P450_{scc}, 3 β -HSD, P450_{c17}, CYP19A1 (P450_{arom}) e STAR ocorrem durante a puberdade em células de Leydig bubalina.

Embora a inibição da atividade do gene PTGS2(COX-2) aumente a expressão de RNAm de gene STAR em células de Leydig de camundongos [20], em células de Leydig bubalina, é provável que a regulação da expressão de STAR pela PTGS2(COX-2) não ocorra em búfalos, pois não se observou o mesmo padrão dos camundongos.

O presente estudo demonstrou que os níveis séricos de RNAm do gene P450 testicular aumentaram acentuadamente durante a puberdade, indicando que a expressão aumentou junto ao crescimento testicular. O que corrobora com a literatura para o gene, nos quais suas enzimas são indispensáveis para a síntese de estrogênio, necessária para espermatogênese [21, 22].

Portanto, pode-se deduzir que a síntese de estrogênio é aumentada durante a puberdade, quando a espermatogênese é iniciada, como é visto em outras espécies [23].

Para a regulação da expressão gênica esteroidogênica em testículos de ratos, a testosterona aumenta a expressão do gene P450_{arom} [24]. O estrogênio reduz o nível de RNAm do P450_{c17}, e as alterações na expressão gênica testicular de CYP19A1 (P450_{arom}) e P450_{c17} durante a puberdade podem ser afetadas pela testosterona e / ou estrogênio produzido no testículo [25].

Em relação à interação regulatória de fatores esteroidogênicos em células de Leydig, o aumento da expressão do gene PTGS2(COX-2) com o envelhecimento diminui a expressão de STAR, resultando na diminuição da produção de testosterona em ratos [26]. No presente estudo, no entanto, não foi encontrada relação entre o envelhecimento e a expressão do genes STAR, PTGS2(COX-2) ou PTGS1 (COX-1) RNAm. Estes resultados sugerem que a COX não regula a expressão de STAR em testículos bubalinos durante o envelhecimento.

5. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que as alterações nos testículos de bubalinos criados extensivamente são bastante frequentes, com maior prevalência para a faixa etária de 31 a 55 meses idades. Os volumes testiculares desses animais aumentaram e por consequência o diâmetro nos túbulos seminíferos com o passar da idade. Os níveis de mRNA testicular dos genes P450scc, 3 β -HSD, STAR, PTGS1 (COX-1), PTGS2 (COX-2) e, especialmente, CYP19A1 (P450arom), aumentaram em associação com o crescimento testicular durante a puberdade.

Em contraste, os níveis de RNAm testicular do gene P450arom foram negativamente relacionados com o envelhecimento. Estes achados sugerem que esses fatores estão associados a mudanças na capacidade de sintetizar esteroides nos testículos bubalinos durante a puberdade e o envelhecimento.

6. REFERÊNCIAS

- [1] IBGE 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em 30/05/2019.
- [3] HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Manole, p.33-53, 2004.
- [4] BARBOSA, E.M. *et al.* Prevalence of reproductive abnormalities in the buffalo genital tract in Amazon Region, Brazil. **Rev Vet**, v.21, suppl.1, p.955-957, 2010.
- [5] JÚNIOR, G.N. *et al.* Brucelose em touros: uma visão da doença no Brasil com ênfase ao diagnóstico e sua importância ao agronegócio. **Tekhne e Logos**, Botucatu, SP, v.3, n.3, p.4, novembro, 2012.
- [6] VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUSA, J. S., SILVA, A. O.A; BARBOSA, E. M.; ROLIM FILHO, S. T. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.141-155, abr./jun. 2008. Disponível em: www.cbra.org.br. 2008.
- [7] SAMBROOK, J. E RUSSELL, DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**.3^a edição, Science Press, Beijing, 461-471. 2002.
- [8] SILVA, N. Detecção de patógenos no sêmen. **Revista de Biotecnologia**, Ciência e Desenvolvimento, v.2, p.28-30, 2011.
- [9] SEIXAS, V.N.C.; CARDOSO, E.C.; Determinação da cronologia dentária em machos bubalinos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado do Pará. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p.529-535, 2007.

- [10] UNANIAN MM, SILVA AEDF, MCMANUS C, CARDOSO EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira Zootecnia**, 29(1), 136-144, 2000.
- [11] BAILEY, T.L.; HUDSON, R.S.; POWE, T.A. *et al.* Caliper and ultrasonographic measurement of bovine testicles and mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, p.581- 594, 1998.
- [12] COETTI, N. **Métodos de coloração histológicas e citológicas**. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da UFRGS, 1996. 118 p.
- [13] OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D. Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 299-306, jul/set., 2007. Disponível em: www.cbra.org.br. 2007.
- [14] PACHECO, A.; et al. Avaliação da biometria testicular em Búfalos jovens criados na região Norte do Rio de Janeiro In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 15. 2005, Campo Grande-MS. **Anais...** Campo Grande, Congresso Brasileiro de Zootecnia 2005. mrp-116.
- [15] BONGSO, T.A.; HASSAN, M.D. NORDIN W. Relationship of scrotal circumference and testicular volume to age and body weight in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 22, p.127-134. 1984.
- [16] PASSIPER, MILTON; BORELLI, VINCENTE; MIGLINO, MARIA ANGÉLICA. Contribuição ao estudo da vascularização arterial do testículo de búfalos da raça Murrah. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 35, n.1, p.12-19, 1998.
- [17] MOURA AAA, RODRIGUES GC, MARTINS FILHO R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça Nelore. **Rev. Bras. Zootec**, 2002, 31(2, Suppl.), 934-943.
- [18] VALE, W. G. **Application of reproductive techniques in buffalo**. Proceedings of the 5th asian buffalo congress on social economic contribution of buffalo to rural areas, Nanning, China, v.1, p. 140–154. 2006.
- [19] JOHNSON, L. *et al.* Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 471–480, 2000.
- [20] WANG X, DYSON MT, JO Y, STOCCO DM. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory gene expression in MA-10 mouse Leydig cells. **Endocrinology**, 2003; 144: 3368–75.

- [21] O'SHAUGHNESSY PJ. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. **Semin Cell Dev Biol**, 2014; 29: 55–65.
- [22] ANKARBERG-LINDGREN C, NORJAVAARA E. Twenty-four hours secretion pattern of serum estradiol in healthy prepubertal and pubertal boys as determined by a validated ultra-sensitive extraction RIA. **BMC Endocr Disord** 2008; 8:10.
- [23] BOURGUIBA S, GENISSEL C, LAMBARD S, BOURAIMA H, CARREAU S. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2003; 86:335–43.
- [24] SAKAUE M, ISHIMURA R, KUROSAWA S, FUKUZAWA N, KUROHMARU M, HAYASHI Y, *et al.* Administration of estradiol-3-benzoate downregulates the expression of testicular steroidogenic enzyme genes for testosterone production in the adult rat. **J Vet Med Sci** 2002; 64:107–13.
- [25] WANG X, SHEN CL, DYSON MT, EIMERL S, ORLY J, HUTSON JC, *et al.* Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis. **Endocrinology** 2005; 146:4202–8.