

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

NARA CLARA LAZARONI E MERCHID

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE A QUALIDADE SEMINAL, LIBIDO E
NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA EM TOUROS CRUZADOS
(*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*)**

ALEGRE-ES

2017

NARA CLARA LAZARONI E MERCHID

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE A QUALIDADE SEMINAL, LIBIDO E
NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA EM TOUROS CRUZADOS
(*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal. Orientador: Dr. Fabrício Albani de Oliveira.

ALEGRE-ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

Merchid, Nara Clara Lazaroni e, 1990-
M553e Efeito da suplementação nutricional na qualidade seminal, libido e níveis séricos de insulina em touros cruzados (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* / Nara Clara Lazaroni e Merchid. – 2017.

83 f. : il.

Orientador: Fabrício Albani Oliveira.

Coorientador: Jurandy Penitente Filho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Bovino. 2. Reprodução animal. 3. Suplementos dietéticos. 4. Semên. I. Oliveira, Fabrício Albani. II. Penitente Filho, Jurandy. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

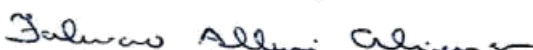
NARA CLARA LAZARONI E MERCHID

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE A QUALIDADE SEMINAL, LIBIDO E
NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA EM TOUROS CRUZADOS
(*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*)**

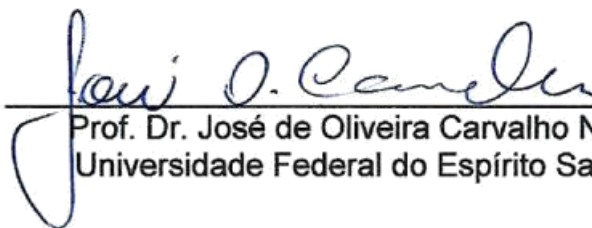
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovado em 31 de julho de 2017.

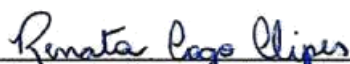
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Fabrício Albani de Oliveira
Instituto Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.ª Dr.ª Renata Cogo Clipes
Instituto Federal do Espírito Santo

Aos meus pais, com todo amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS, por sempre guiar meus caminhos, me abençoando a cada dia. A minha família, pelos cuidados, carinho e apoio incondicional, dando força e incentivo, em especial, a minha mãe, Maria Auxiliadora de Souza Lazaroni e Merchid, e meu pai, Jésus de Azevedo Merchid, que são a minha força e meus alicerces. Aos meus amigos, que acreditaram no meu potencial. Em especial, aos que estiveram ao meu lado durante os momentos mais trabalhosos: Larissa Sena, Letícia Fregulhia, Thadeu Castro, Higor Assis, Kallil Castro e Lucas Raad. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Agradeço ao orientador, Dr. Fabrício Albani Oliveira, por ter aceitado o convite em me orientar e contribuir para a realização do experimento. Agradeço ao meu coorientador, Dr. Jurandy Penitente Filho, pela dedicação, paciência e, principalmente, pela amizade. Ao técnico do Laboratório IPOA, Ítalo Câmara, pela disponibilidade em ajudar e contribuir com o experimento. A todos os professores e funcionários da pós-graduação da UFES, em especial, aos professores José de Oliveira Carvalho Neto e Carla Braga Martins, que foram fundamentais para a minha formação profissional, estando sempre solícitos a me atender nas dificuldades. Aos professores, Welligton Ronildo Clarindo e Adriana Madeira Alvares da Silva Conforti, pela colaboração no decorrer deste trabalho. Aos funcionários do setor de zootecnia III na bovinocultura do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), por ajudar na realização do projeto, e por me receberem com tanto carinho em todos os dias de coleta.

À Instituição Federal do Espírito Santo, por disponibilizar os animais e o local do experimento. À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo curso de mestrado oferecido. À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de caráter, e quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

MERCHID, NARA CLARA LAZARONI E. **Efeito da suplementação na qualidade seminal, libido e níveis séricos de insulina em touros cruzados (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*)**. 2017. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação na libido, qualidade espermática e concentrações séricas de insulina de touros mestiços e jovens. Foram utilizados 12 animais hípidos, púberes, cruzados (3/4 Holandes x Gir), com idade média de 19 meses. Os animais foram divididos igual e aleatoriamente em grupo suplementado e grupo controle. Ambos os grupos permaneceram em piquete de *Brachiaria brizantha*, com acesso a sal mineral proteínado e água *ad libitum*. O grupo suplementado recebeu concentrado contendo 20% de proteína bruta e 70% de nutrientes digestíveis totais, com consumo diário de 1,0% de peso vivo do animal, do dia 1 até o dia 70. As coletas de sêmen foram realizadas semanalmente no setor de bovinocultura do Instituto Federal do Espírito Santo. O sêmen foi avaliado quanto à cor, odor, aparência, volume (mL), turbilhonamento (0-5), motilidade espermática total (%), vigor (0-5), concentração espermática (sptz/mL), morfologia espermática, teste de termorresistência (TTR) e teste hiposmótico (HOST). Nos dias 0, 35 e 70 foi realizado o teste da libido, pesagem dos animais, aferição da circunferência escrotal e coletadas amostras de sangue para realização da dosagem da concentração sérica de insulina. As variáveis quantitativas foram avaliadas em modelos mistos lineares com medidas repetidas no tempo; os escores dados para a variável libido foram utilizados para a classificação em questionável, bom, muito bom e excelente. As frequências das classificações foram arranjadas em tabelas de contingência e as associações entre as classificações e os tratamentos foram avaliadas pelo teste exato de Fisher ou teste de Freeman-Halton. Para as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis; a 5% de significância. Não houve diferenças para motilidade, vigor com 180min após a coleta, concentração espermática, espermatozoides totais, espermatozoides viáveis, morfologia espermática maior, teste hipostático e concentrações séricas de insulina. Foi encontrado diferença significativa para turbilhonamento, vigor em tempo 0 após coleta e morfologia espermática totais e menores. As variáveis circunferência

escrotal, peso e ganho médio diário são altamente relacionados à precocidade e ganho reprodutivo, e foram positivamente influenciadas pelo tratamento.

Palavras chaves: Bovino, Reprodução, Suplementação.

ABSTRACT

MERCHID, NARA CLARA LAZARONI E. **Effect of supplementation on seminal quality, libido and serum insulin levels in crossbred bulls (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*)**. 2017. 80p. Dissertation (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

The objective of this study was to evaluate the effect of supplement on libido, sperm quality and serum insulin concentrations of mestizo and young bulls. Twelve healthy, pubescent, crossbred (3/4 Holstein x Gir) animals, averaging 19 months, were used. The animals were divided equally and randomly into the supplemented and control groups. Both groups are in the *Brachiaria brizantha* picket, with access to protein mineral salt and water ad libitum. The group supplemented with concentrate containing 20% crude protein and 70% of total digestible nutrients, with daily consumption of 1.0% of live weight of the animal from day 1 to day 70. As semen collections were carried out weekly without sector of the Federal Institute of Espírito Santo. (0-5), total sperm motility (%), vigor (0-5), sperm concentration (sptz / mL), sperm morphology, test (s), evaluated for color, odor, appearance, volume, (TTR) and hyposmotic test (HOST). On days 0, 35 and 70 it was performed for libido testing, animal weighing, circumference gauging and blood sample collection for measurement of insulin concentration measurement. The quantitative variables were evaluated in linear mixed models with measures repeated in time; the given scores for a libido variable to use for a questionable, good, very good and excellent rating. The frequencies of the distributions were arranged in contingency tables and as associations between the correction and the treatments as evaluated by Fisher's exact test or Freeman-Halton test. For as qualitative variables, used as Kruskal-Wallis test; a 5% significance level. There was no difference for motility, vigor with 180 min after collection, sperm concentration, total spermatozoa, viable spermatozoa, greater sperm morphology, hypostatic test and serum insulin concentrations. Significant difference was found for whirling, vigor at time 0 after collection and total and minor sperm morphology. As variables scrotal circumference, weight and mean daily gain are highly related to precocity and reproductive gain, and thus are positively influenced by treatment.

Key-words: Bovine, Reproduction, Supplementation.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
FIGURA 1: ESPERMATOZOIDE MOSTRADO EM CORTE LONGITUDINAL.	17
FIGURA 2: RESUMO DO CIRCUITO ENDÓCRINO QUE CONTROLA A ESPERMATOGÊNESE. O HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) E O HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE (FSH) SÃO SECRETADOS NA CORRENTE SANGUÍNEA PELA ADENO-HIPÓFISE, EM RESPOSTA AO GNRH HIPOTALÂMICO. O LH IRÁ ATUAR NAS CÉLULAS DE LEYDIG PARA PRODUZIR HORMÔNIOS ESTEROIDES, PRINCIPALMENTE TESTOSTERONA (T), QUE PODE SER AROMATIZADA, PELA ENZIMA AROMATASE, EM ESTRADIOL (E2) NAS CÉLULAS DE SERTOLI. T E E2 ATUAM NA ESPERMATOGÊNESE E TEM EFEITO DE FEEDBACK NEGATIVO NO HIPOTÁLAMO (VIA CONTROLE DA SECREÇÃO DE GNRH) E DA HIPÓFISE PARA LIMITAR A SECREÇÃO DE LH E FSH. O FSH ESTIMULA AS CÉLULAS DE SERTOLI A ATUAR NA ESPERMATOGÊNESE. EM RESPOSTA À FSH, O EPITÉLIO SEMINÍFERO PRODUZ INIBINA, QUE IRÁ SUPRIMIR A PRODUÇÃO DE FSH.....	20
FIGURA 3: RESUMO DA AÇÃO DE HORMÔNIOS INFLUENCIADOS PELA DIETA NO CONTROLE ENDÓCRINO DO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL. A INSULINA PRODUZIDA PELO PÂNCREAS PARTICIPA ESTIMULANDO A PRODUÇÃO DE IGF-I (FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO 1) PELO FÍGADO, SUA PRESENÇA AFETA A CONCENTRAÇÃO CIRCULANTE DE LEPTINA. O GH (HORMÔNIO DE CRESCIMENTO) É PRODUZIDO PELA HIPÓFISE E ATUA NO TECIDO ADIPOSEO ESTIMULANDO A PRODUÇÃO DE LEPTINA. TODOS ESSES HORMÔNIOS INFLUENCIAM O HIPOTÁLAMO A PRODUZIR E SECRETAR O GNRH (HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA) DESENCADEANDO A CASCATA HORMONAL DO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL. EXCETO PELA LEPTINA, TODOS OS OUTROS HORMÔNIOS TAMBÉM AGEM DIRETAMENTE NOS TESTÍCULOS PRODUZINDO HORMÔNIOS ESTEROIDES, QUE REALIZAM O FEEDBACK NEGATIVO NO HIPOTÁLAMO.	23
FIGURA 4: PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS LISTADAS CONFORME A REGIÃO ANATÔMICA DO ESPERMATOZOIDE:1 A 10. DEFEITOS DE ACROSSOMA - 1. AFROUXADO; 2. INCHADO; 3. DOBRADO; 4-7. KNOBBED (4. ELEVADO; 5. EM PONTA; 6. DUAS PONTAS; 7. ACHATADO); 8. ENRUGADO; 9-10. INCOMPLETO. 11 A 22. DEFEITOS RELACIONADOS A CABEÇA - 11. NORMAL; 12. DELGADA; 13. ALONGADA;, 14 E 15. DELGADA NA BASE; 16. PIRIFORME; 17 E 19. GRANDE; 18. PEQUENA NORMAL; 20. ARREDONDADA; 21. PEQUENA	

PATOLÓGICA; 22. CABEÇAS DUPLAS. 23 A 35. DEFEITOS DE PEÇA INTERMEDIÁRIA - 23 GROSSAS; 24. PSEUDOGOTA; 25. FILIFORME; 26. MORDIDA; 27. IMPLANTAÇÃO ABAXIAL; 28. SACA-ROLHA; 29 E 33. DESSASOCIADA OU COM APLASIA SEGMENTAR; 30. DUPLA; 31. DIVIDIDA; 32. DESDOBRADA; 34. QUEBRADAS, 35. DOBRADA NA CABEÇA. 36 A 41. DEFEITOS DE CAUDA – 36 E 37. CAUDA DOBRADA SIMPLES; 38. CAUDAS ENROLADAS SIMPLES; 39 E 40. FORTEMENTE ENROLADA OU DOBRADA; 41. CAUDA E PEÇA INTERMEDIARIA ENROLADA NA CABEÇA; 42. GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL; 44 E 45. GOTA CITOPLASMÁTICA DISTAL; 46. CABEÇA ISOLADA NORMAL OU DECAPITADA.	34
FIGURA 5: MONTA INCOMPLETA COM EXPOSIÇÃO DO PÊNIS, NOTA 04 (ENTRE 0 E 10) E ESCORE “BOM” DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE PINEDA ET AL., (1997).....	38
FIGURA 6: AFERIÇÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, FEITA POR FITA MÉTRICA NA ALTURA DE MAIOR CIRCUNFERÊNCIA DOS TESTÍCULOS.	41
FIGURA 7: COLETA DE SANGUE REALIZADA ATRAVÉS DA PUNÇÃO DA VEIA CAUDAL DO TOURO.	47
FIGURA 8: ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS COM PATOLOGIA MORFOLÓGICA, EM AUMENTO DE 400X. A- GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL, B- CAUDA FORTEMENTE DOBRADA OU ENROLADA, C- GOTA CITOPLASMÁTICA DISTAL.	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
GRÁFICO 1: GRÁFICO EM BARRAS (MÉDIAS ± ERRO PADRÃO) DO PESO (KG) AVALIADOS NOS DIAS 0, 35 E 70 DE TOUROS, ¾ HOLANDES X GIR, PÚBERES, RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO (N = 6) E NÃO SUPLEMENTADOS (CONTROLE, N = 6).....	50
GRÁFICO 2: GRÁFICO EM BARRAS (MÉDIAS ± ERRO PADRÃO) DO GANHO MÉDIO DIÁRIO (KG) AVALIADOS NOS DIAS 0, 35 E 70 DE TOUROS, ¾ HOLANDES X GIR, PÚBERES, RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO (N = 6) E NÃO SUPLEMENTADOS (CONTROLE, N = 6).....	51
GRÁFICO 3: GRÁFICO EM PONTOS (MÉDIAS) DOS DEFEITOS MORFOLÓGICOS TOTAIS (%) AVALIADOS NOS DIAS 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 E 70 DE TOUROS ¾ HOLANDÊS X GIR, PÚBERES, RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO PROTEICO/ENERGÉTICA (N = 6) E SEM SUPLEMENTAÇÃO (CONTROLE, N = 6).....	57
GRÁFICO 4: GRÁFICO EM PONTOS (MÉDIAS) DOS DEFEITOS MORFOLÓGICOS MAIORES (%) AVALIADOS NOS DIAS 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 E 70 DE TOUROS ¾ HOLANDÊS X GIR, PÚBERES, RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO PROTEICO/ENERGÉTICA (N = 6) E SEM SUPLEMENTAÇÃO (CONTROLE, N = 6).....	58
GRÁFICO 5: GRÁFICO EM PONTOS (MÉDIAS) DOS DEFEITOS MORFOLÓGICOS MAIORES (%) AVALIADOS NOS DIAS 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 E 70 DE TOUROS ¾ HOLANDÊS X GIR, PÚBERES, RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO PROTEICO/ENERGÉTICA (N = 6) E SEM SUPLEMENTAÇÃO (CONTROLE, N = 6).....	59
GRÁFICO 6: GRÁFICO EM BARRAS DEMONSTRANDO AS DIFERENÇAS (P≤ 0,05) DAS MÉDIAS ± ERRO PADRÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA (NG/ML) ENTRE OS DIAS (D0, D35 E D70) NOS GRUPOS COM E SEM ADMINISTRAÇÃO DE FLUSHING.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
QUADRO 1: INGREDIENTES E SUAS QUANTIDADES EM QUILOGRAMAS, PARA O PREPARO DE 100 KG DO CONCENTRADO FORNECIDO PARA OS TOUROS TRATADOS COM SUPLEMENTAÇÃO.	40
QUADRO 2: CLASSIFICAÇÃO DAS PATOLOGIAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZOIDES, EM DEFEITOS MAIORES E MENORES, SEGUNDO BLOM (1973).	44
QUADRO 3: CLASSIFICAÇÃO DA LIBIDO DE ACORDO COM REAÇÃO DO TOURO EXPOSTO POR 15 MINUTOS A DUAS FÊMEAS EM ESTRO, BASEADO NO COMPORTAMENTO DESCRITO POR PINEDA ET AL. (1997).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
TABELA 1: MÉDIAS ± ERRO-PADRÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CM) EM FUNÇÃO DOS DIAS, EM TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDÊS/GIR, NO GRUPO CONTROLE (N=6) E NO GRUPO RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO (N=6).	52
TABELA 2: MÉDIA ± ERRO PADRÃO DO VOLUME DO EJACULADO (ML) DE TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDÊS/GIR, EM DIETA CONTROLE (N=6) E RECEBENDO FLUSHING NUTRICIONAL (N=6).	53
TABELA 3: MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DO MOVIMENTO DE MASSA (TURBILHONAMENTO - 0 A 5), DE TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDES/GIR, EM DIETA CONTROLE (N=6) E RECEBENDO FLUSHING NUTRICIONAL (N=6).	54
TABELA 4: MÉDIA ± ERRO PADRÃO MOTILIDADE (%) E VIGOR (0-5) NO MOMENTO IMEDIATAMENTE APÓS A COLETA DO SÊMEN E DEPOIS 180 MIN EM BANHO-MARIA A 37°C, DE TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDES/GIR, EM DIETA CONTROLE (N=6) E RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL (N=6).	55
TABELA 5: MÉDIAS ± ERRO-PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO (x10 ⁶ SPTZ/ML) E NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZOIDES (x10 ⁶ SPTZ), DE TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDES/GIR, EM DIETA CONTROLE (N=6) E RECEBENDO FLUSHING NUTRICIONAL (N=6).	56
TABELA 6: MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DO TESTE DO HIPOSMÓTICO EM FUNÇÃO DOS DIAS, EM TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDÊS/GIR, EM DIETA CONTROLE (N=6) E RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO (N=6).	61
TABELA 7: NÚMERO DE TOUROS COM ESCORE DE LIBIDO CLASSIFICADO COMO: QUESTIONÁVEL (QN), Bom (BO), MUITO BOM (MB) E EXCELENTE (EX) DE ACORDO COM OS GRUPOS (SUPLEMENTAÇÃO E CONTROLE) E DIA DE AVALIAÇÃO.	61
TABELA 8: MÉDIA ± ERRO PADRÃO DO TEMPO DE REAÇÃO (MINUTOS) NO TESTE DE EFICIÊNCIA EM CONDUTA SEXUAL DE TOUROS PÚBERES, ¾ HOLANDÊS/GIR, EM DIETA CONTROLE (N=6) OU RECEBENDO SUPLEMENTAÇÃO (N=6).	62

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Anatomia reprodutiva do macho bovino.....	13
2.2 Espermatogênese.....	14
2.2.1 Espermacitogênese.....	15
2.2.2 Espermiogênese.....	15
2.2.3 Morfologia do espermatozoide.....	16
2.2.4 Trânsito Epididimário, maturação e capacitação espermática.....	17
2.3 Endocrinologia Reprodutiva do Macho.....	19
2.4 Endocrinologia regida pela ingestão de alimento.....	21
2.5 Exigência Nutricional dos Bovinos.....	23
2.6 Suplementação Proteico/Energética.....	24
2.7 Puberdade e Maturidade Sexual.....	26
2.8 Exame andrológico.....	28
2.8.1 Avaliação do aparelho reprodutivo.....	28
2.8.1.1 Perímetro escrotal.....	29
2.8.2 Avaliação seminal e espermática.....	30
2.8.2.1 Coleta de sêmen.....	30
2.8.2.2 Características Macroscópicas.....	31
2.8.2.3 Características microscópicas.....	31
2.8.3 Testes complementares.....	34
2.8.3.1 Teste Hiposmótico.....	35
2.8.3.2 Teste de Termorresistência.....	35
2.9 Libido.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	39
3.1 Local e data.....	39
3.2 Animais e tratamento.....	39
3.3 Coleta de sêmen.....	41
3.6 Testes complementares.....	44
3.6.1 Teste hiposmótico.....	44

3.6.2	Teste de Termo-resistência	45
3.6.3	Avaliação da Libido	45
3.6.4	Concentração de Insulina circulante	46
3.7	Análises Estatísticas	48
3.8	Comitê de ética no uso de animais – CEUA	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5	CONCLUSÃO	65
6	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO A: Ficha de Avaliação de Exame Andrológico	79
	ANEXO B – Ficha de Avaliação da libido	80

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a nutrição influencia diretamente o desenvolvimento e funcionamento dos órgãos relacionados a reprodução. A ingestão adequada de nutrientes é fundamental para um bom desempenho reprodutivo em bovinos, levando ao aumento da sua produtividade (NEIVA, 2000).

Geralmente, nas condições brasileiras de pecuária, a disponibilidade de forragem é estacional. Nesse sentido, nas épocas de baixa oferta de forragem (estações de dias mais curtos), torna-se de extrema importância o fornecimento de suplementação para a manutenção da aquisição de nutrientes em quantidade necessária para o bom funcionamento dos órgãos reprodutivos nos animais, garantindo crescimento contínuo e redução no ciclo de produção (NEIVA, 2000; REIS et al., 2011).

Além disso, a suplementação auxilia em casos de animais que não consomem forragem suficiente para manutenção das suas condições fisiológicas, por não serem de boa qualidade, tendo baixa digestibilidade e/ou pouca concentração proteica (NEIVA, 2000). O consumo insuficiente de energia interfere negativamente sobre a fertilidade, retardando o início da produção espermática e a maturidade sexual do macho (KASTELIC, 2014; CUNHA et al., 2015).

O rebanho bovino brasileiro possui cerca de 215,2 milhões de cabeças (IBGE 2015). De acordo com o último relatório da Associação Brasileira de Inseminação Artificial, apenas 10% das matrizes nacionais são inseminadas (ASBIA, 2011). Diante desses dados, torna-se claro a importância da fertilidade do touro dentro do rebanho e a necessidade de maximizar a eficiência reprodutiva desses animais a fim de uma melhor produtividade na pecuária.

A utilização de dietas que causam hiperinsulinemia e a suplementação podem aumentar os níveis de glicose, insulina e IGF-I (Lucy, 2011). Além disso, um dos efeitos positivos da insulina no sistema reprodutivo deriva da sua capacidade de estimular a secreção de leptina (ROA, J.; TENA-SEMPERE, 2014). A utilização dessa estratégia melhora o status energético dos animais, podendo contribuir para uma maior eficiência reprodutiva (VASCONCELOS, LEIVA e PERES, 2014). A insulina, bem como, a leptina, possui sítios de ligação no hipotálamo, regulando de forma indireta a reprodução, aumento os estímulos para produção e secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnTH), que irão potencializar a liberação de hormônio

folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Esses irão atuar sobre as gônadas e são responsáveis por produzir estradiol pelas células de Sertoli e a testosterona através da célula de Leydig, respectivamente (CHENOWETH; KASTELIC, 2007; CHENOWETH; KASTELIC, 2007; ROA e TENA-SEMPERE, 2014).

Bruning e colaboradores (2000) pré-selecionaram ratos que não possuíam receptores de insulina no hipotálamo que passaram a exibir quadros de obesidade e também disfunção gonadal, principalmente devido à deficiência de GnRH. Portanto, sugere-se um papel estimulante da insulina no controle do eixo gonadotrópico (ROA, J.; TENA-SEMPERE, 2014).

Dessa forma, o objetivo de desenvolver esse trabalho foi avaliar a influência da suplementação no comportamento sexual (libido), qualidade seminal e concentrações séricas de insulina de touros púberes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia reprodutiva do macho bovino

O sistema reprodutivo do touro compreende os seguintes órgãos: os testículos e escrotos, cordão espermático, epidídimo, ducto deferente e ampola, pênis e prepúcio, e as glândulas acessórias (vesículas seminais, próstata e as glândulas bulbouretrais) (FRANDSON; LEE WILKE; DEE FAILS, 2005).

Os testículos possuem formato oval ou alongado, com consistência tenso-elástica, e são encontrados anatomicamente na vertical e paralelos um ao outro. São responsáveis pela produção dos espermatozoides e alguns hormônios, principalmente a testosterona (CBRA, 2013). O escroto envolve os testículos, o epidídimo e início do ducto deferente e é constituído de túnica vaginal, fáschia espermática interna, fáschia cremastérica, fáschia espermática externa, lâmina fibro-elástica, denominada túnica dardos e por último, a pele. Ele tem por finalidade a proteção dos testículos, e participação no processo de termorregulação testicular (FAYRER-HOSKEN, 1997).

O cordão espermático é composto por artéria testicular, plexo venoso pampiniforme, veias testiculares, vasos linfáticos e nervos autônomos, estes unem-se a artéria do ducto deferente e aos feixes de tecido muscular liso, e circundam os vasos e lâmina visceral da túnica vaginal (FAYRER-HOSKEN, 1997).

O epidídimo é um ducto altamente enrolado, alinhado por um epitélio pseudoestratificado complexo, constituído por células principais, basais, claras, apicais e halo (KEMPINAS ; KLINEFELTER, 2014). É composto por segmento inicial e cabeça que ficam situadas na parte proximal das gônadas, corpo, instalado na fase medial, e cauda, localizada na extremidade distal dos testículos. Possui função de armazenamento e maturação dos espermatozoides produzidos pelos tubulos seminíferos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ducto deferente é uma continuação do epidídimo que se estende até a uretra, e porta-se como canal de passagem para os espermatozoides (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Ao fim do ducto deferente encontra-se as ampolas, que são uma dilatação deste, e estão localizadas entre as vesículas seminais (GALLOWAY, 1974).

O órgão responsável pela copula é o pênis, constituindo-se de tecido fibroelástico, possui dois corpos cavernosos dorsais, um corpo esponjoso e uma

glande. Em ruminantes e suínos, é encontrado o “S” peniano ou flexura sigmoide, que é sustentado pelo músculo retrator do pênis, e durante a ereção apresenta-se distendido (GONÇALVES et al., 2008). O prepúcio cobre o pênis em estado de repouso, oferecendo-lhe proteção, é composto externamente por pele e internamente pela cavidade prepucial (KONIG; LIEBICH, 2016).

A maior fração do volume seminal, bem como o fornecimento de um ambiente bioquimicamente apropriado para a sobrevivência dos espermatozoides, é obtido por meio das glândulas acessórias (FRANDSON; LEE WILKE; DEE FAILS, 2005). A próstata é uma glândula tubuloalveolar ramificada, que desemboca na uretra prostática. Em bovinos, o seu comprimento varia de 3 a 4 cm, e tem por finalidade produzir o líquido prostático, que protegerá e nutrirá os espermatozoides após a ejaculação (GONÇALVES et al., 2008).

As glândulas vesiculares variam de 8 a 15 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura, sendo alongadas, lobuladas. São responsáveis por produzir o líquido seminal, que nutre e facilita a mobilidade dos espermatozoides (FAYRER-HOSKEN, 1997). Já as glândulas bulbouretrais são tubuloalveolares, situam-se caudal as outras glândulas acessórias, um em cada lado da uretra pélvica. A glândula bulbouretral irá participar da produção do fluído pré-ejaculatório, sendo fonte de energia e proteção dos espermatozoides, lubrificando a uretra e a extremidade do pênis, diminuindo a quantidade de espermatozoides danificados durante a ejaculação (FRANDSON; LEE WILKE; DEE FAILS, 2005).

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de produção dos gametas masculinos, e ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos. Nos machos, a produção segue de maneira contínua durante toda vida sexual ativa dos animais, e sofre influência do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) devido a sua ação nas células de Sertoli (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003; FILHO, 2006).

Na espécie bovina, a espermatogênese tem duração média de 60 dias, compreendendo a fase da célula primordial até sua maturação (RUSSELL et al., 1990) e é dividida em duas fases: espermatocitogênese e espermiogênese (BALL; PETERS, 2006).

2.2.1 Espermacitogênese

O epitélio dos túbulos seminíferos são compostos por três tipos celulares básicos: as células de Sertoli, células mióides e as células germinativas em desenvolvimento (FILHO, 2006). O processo de espermacitogênese ocorre entre as células de Sertoli, e trata-se de sucessivas divisões mitóticas, diferenciações e divisões meióticas, partindo de células germinativas diploides até dar origem células haploides (O'DONNEL et al., 2001). Sendo que as células germinativas pouco diferenciadas podem ser divididas em: espermatogônias tipo A e espermatogônias tipo B, que são as células aptas a se dividir para formar espermátocitos primários (JOHNSTON et al., 2001).

A espermatocitogênese compreende a divisão mitótica das espermatogônias A1, formando células mais diferenciadas, denominadas de espermatogônias A2, A3, intermediárias, B1 e B2. As espermatogônias B1 e B2 dividem-se e dão origem a dois espermátocitos primários, que por meiose forma os espermátocitos secundários. Ao final da segunda meiose, realizada pelos espermátocitos secundários, originam-se as espermátides (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

O processo de espermatocitogênese divisional abrange desde a espermatogônia até sua diferenciação em espermátide, e leva aproximadamente 45 dias no touro (GARNER; HAFEZ, 2004).

2.2.2 Espermiogênese

Caracteriza-se espermiogênese a diferenciação das espermátides em espermatozoides (BALL; PETERS, 2006). Nesse estágio de desenvolvimento, não ocorrem mais divisão celular, uma vez as espermátides já são células haploides. Sendo assim, nessa fase, ocorre formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento do flagelo e grande perda do citoplasma (KNOLBIL; NEIL, 1993). Podendo ser dividida em quatro fases: de golgi, capa, acrossomo e de maturação (KNOLBIL; NEIL, 1993).

A fase de golgi é caracterizada pela formação dos grânulos pró-acrossomáticos dentro do aparelho de Golgi. Os grânulos acrossomais formados se unem e em seguida, aderem ao envelope nuclear. O centríolo proximal migra aproximadamente

ao núcleo, local onde se acredita que forme uma base para a união da cauda à cabeça (FILHO, 2006).

Na fase de capa, ocorrerá a difusão dos grânulos acrossomais aderentes sobre o núcleo da espermatíde. Durante essa etapa, os componentes de axonemas em desenvolvimento na cauda alongam-se além da periferia do citoplasma celular (HAFEZ; HAFEZ, 2004, FILHO, 2006).

Dentre as fases da espermiogênese, a acrossômica é a que mais proporciona alterações na morfologia da célula, envolvendo alterações nucleares, acrossômica e nas caudas das espermatídes em desenvolvimento (BARTH, 1989). Durante as modificações nucleares, ocorre a condensação da cromatina dentro de densos grânulos e a mudança do núcleo esférico para uma estrutura alongada. O acrossomo que se encontra aderente ao núcleo, se alonga a fim de corresponder à forma do núcleo (FILHO, 2006).

As mitocôndrias que estão distribuídas pelo citoplasma das espermatídes começam a se concentrar próximo ao axonema, formando a bainha que caracteriza a peça intermediária da cauda (FILHO, 2006).

Na fase de maturação ocorrem as transformações finais das espermatídes em espermatozoides, que serão liberados para o lúmen dos túbulos seminíferos por meio das células de Sertoli (BARTH, 1989).

Após essas fases, ocorrerá o evento de espermição, que será a passagem das células germinativas para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, acompanhados do processo de fagocitose das células em degeneração pelas células de Sertoli (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.2.3 Morfologia do espermatozoide

Os espermatozoides possuem duas regiões morfológica e funcionalmente distintas, e envoltas por uma única membrana plasmática, sendo: cauda, que impulsiona o espermatozoide por meio do trato reprodutivo da fêmea e auxilia no processo de fecundação, e a cabeça, que comporta o núcleo haploide extremamente condensado (ALBERTS, 2008).

Na região da cabeça, posicionado próximo à extremidade anterior do envelope nuclear, encontra-se a vesícula acrossômica ou acrossomo. Quando o

espermatozoide se liga a receptores da zona pelúcida do oócito, ocorre o estímulo para reação acrossômica, com exocitose das vesículas acrossomais. Essa reação auxilia na passagem do espermatozoide pela zona pelúcida, que se aloja ao espaço perivitelino (HAFEZ; HAFEZ, 2004; ALBERTS, 2008).

O axonema presente na cauda do espermatozoide consiste em dois microtúbulos centrais simples circundados por nove pares de microtúbulos. A movimentação da cauda ocorre por meio do deslizamento dos pares de microtúbulos adjacentes entre si, esse dobramento é controlado por proteínas motoras (dineínas), as quais utiliza a energia de hidrólise do ATP. A produção do ATP é realizada por um grande número mitocôndrias altamente especializadas, que se concentram na parte superior da cauda, denominada peça intermediária (ALBERTS, 2008).

As duas regiões bem estabelecidas, bem como as organelas dos espermatozoides estão ilustradas na figura 1.

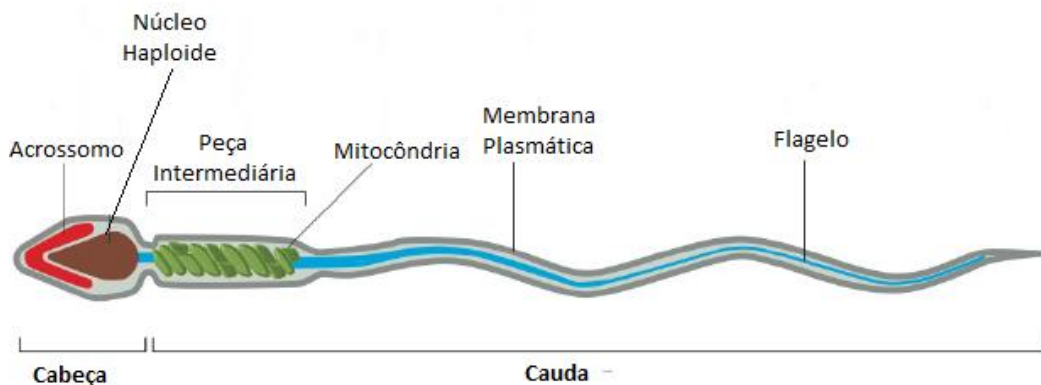


Figura 1: Espermatozoide mostrado em corte longitudinal.
Fonte: Alberts et al., (2008).

2.2.4 Trânsito Epididimário, maturação e capacitação espermática

Os espermatozoides recém-formados pela diferenciação das espermatídes ainda não são capazes de realizar a fecundação. Para tal, são liberados gradativamente dos túbulos seminíferos, por meio da rete testis, para o epidídimo, onde adquirem mobilidade e capacidade fecundante (FRANDSON et al., 2009).

No touro, o tempo despendido para o transporte dos espermatozoides pelo epidídimo é aproximadamente sete dias. No segmento inicial do epidídimo, ocorre uma concentração do fluido procedente do testículo, onde se inicia o primeiro estágio

da maturação espermática (GARNER; HAFEZ, 2004). Modificações funcionais, incluindo o desenvolvimento da potencialidade para manter a motilidade, a perda progressiva de água e a migração distal da gota citoplasmática com sua eventual perda (HAFEZ; HAFEZ, 2004), são etapas da maturação espermática, que se completada no segmento médio (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

Por fim, os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo até o momento da ejaculação. Embora o ambiente epididimário seja favorável a sobrevivência dos espermatozoides, eles não são preservados indefinidamente (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

Na ejaculação os espermatozoides são depositados no trato reprodutivo da fêmea, especificamente na tuba uterina, na região do istmo, onde ocorre a capacitação espermática. Nesse processo, ocorre a mudança no padrão da mobilidade do espermatozoide, induzindo-o a uma hiperativação, que irá facilitar a penetração do espermatozoide no oócito, e a aquisição de capacidade para ocorrência reação do acrossoma (KNOBIL; NEILL, 1993; ALBERTS, 2008; CRUZ et al, 2014).

A capacitação é mediada por proteínas das glândulas sexuais acessórias, e por componentes do fluido do tuba uterina, principalmente albumina, Ca^{2+} e HCO_3^- , causando alterações na estrutura e composição da membrana plasmática dos espermatozoides, como o efluxo de colesterol da superfície espermática, e a desestabilização da bicamada fosfolipídica, sendo imprescindível para a reação acrossômica (BALL; PETERS, 2006; ALBERTS, 2008).

No decorrer desse processo, observa-se um aumento do pH citosólico, a fosforilação de tirosina de várias proteínas espermáticas e a exposição dos receptores de superfície celular, que ajudam o espermatozoide a ligar-se à zona pelúcida (ALBERTS, 2008).

A reação do acrossoma acontece após a aproximação do espermatozoide na zona pelúcida do oócito e a sua ligação a ZP3, no qual irá ocorrer a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, e conseqüentemente, exposição do conteúdo do acrossoma, com liberação de pequenas vesículas. O conteúdo inclui antígenos de superfície, e enzimas digestivas como: hialuronidase e acrosina (SENGER, 2004).

A hialuronidade e acrosina serão responsáveis, pelo desdobramento do ácido hialurônico, componente das células do cummulus, e a enzima proteolítica que digere a zona pelúcida, permitindo dessa forma, a fecundação (SENGER, 2004).

2.3 Endocrinologia Reprodutiva do Macho

O controle endócrino do sistema reprodutivo masculino é fundamentado na comunicação entre os produtos sintetizados e secretados pelo hipotálamo, hipófise anterior (adeno-hipófise), gônadas e células alvo (BALL; PETERS, 2006; SOEDE et al., 2011).

Na adeno-hipófise, são produzidas gonadotrofinas denominadas hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), liberado pelo hipotálamo (JONES; HUNT; KING, 2007; STABENFELDT; DAVIDSON; BRINSKO, 2004).

Nas gônadas masculinas, o LH atua nas células de Leydig por meio de seus receptores de membrana, estimulando a conversão de colesterol em testosterona. A testosterona será responsável pela manutenção das características sexuais secundárias, do comportamento sexual no macho e da produção dos espermatozoides no estágio final da espermatogênese, por meio da atuação nas células de Sertoli (BALL; PETERS, 2006). Ela é carregada para o interior dos túbulos seminíferos pela ligação à proteína secretada pelas células de Sertoli, proteína denominada proteína fixadora de andrógenos (ABP), em resposta ao FSH. Assim, são mantidas elevadas concentrações testiculares de testosterona, fundamental para o processo de espermatogênese (CHENOWETH; KASTELIC, 2007).

A testosterona também participa da regulação da síntese e secreção de LH, por feedback negativo exercido na adeno-hipófise (BRINSKO, 2004).

O FSH estimula a participação das células de Sertoli no processo da espermatogênese até o estágio de espermatócito secundário. As células de Sertoli, além de atuar na conversão de testosterona em estradiol, secreta hormônios reguladores, tais como a inibina e ativina (BRINSKO, 2004; CHENOWETH; KASTELIC, 2007; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A inibina e ativina agem como reguladores de hormônio gonadotrófico. Sendo a inibina responsável por realizar o feedback negativo em nível hipofisário, inibindo

a produção e secreção de FSH, enquanto a testosterona atua fazendo o feedback positivo, estimulando a produção desse hormônio pela hipófise (OONK et al., 1998).

O estradiol realiza a inibição da produção de hormônios gonadotróficos, realizando o feedback negativo em nível hipotalâmico coibindo a secreção de GnRH, e conseqüentemente, a produção de LH e FSH pela hipófise (CHENOWETH; KASTELIC, 2007). Na figura 2, esquematiza-se a ação dos hormônios gonadotróficos sobre as células testiculares e os reguladores do eixo hipotalâmico-hipofisário.

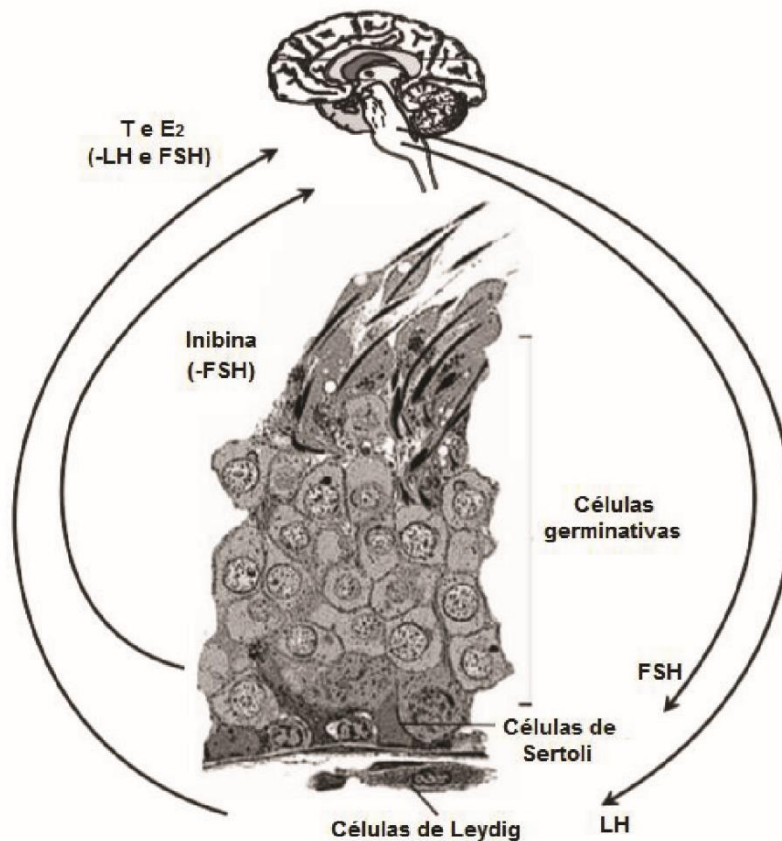


Figura 2: Resumo do circuito endócrino que controla a espermatogênese. O hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) são secretados na corrente sanguínea pela adeno-hipófise, em resposta ao GnRH hipotalâmico. O LH irá atuar nas células de Leydig para produzir hormônios esteroides, principalmente testosterona (T), que pode ser aromatizada, pela enzima aromatase, em estradiol (E2) nas células de Sertoli. T e E2 atuam na espermatogênese e tem efeito de feedback negativo no hipotálamo (via controle da secreção de GnRH) e da hipófise para limitar a secreção de LH e FSH. O FSH estimula as células de Sertoli a atuar na espermatogênese. Em resposta à FSH, o epitélio seminífero produz inibina, que irá suprimir a produção de FSH.

FONTE: (Adaptado de KNOBIL; NIELLS, 1993).

Os hormônios esteroides se ligam aos seus receptores específicos no núcleo da célula-alvo. A interação hormônio-receptor altera diretamente a transcrição de genes específicos, levando à síntese de RNAm pelo núcleo e à subsequente síntese, de proteínas necessárias para promover as respostas características ao hormônio (BENITES; BARUSELLI, 2006). Enquanto os hormônios gonadotróficos possuem receptores de membrana, e atuam através de vias que inibem a adenilciclase, diminuindo os níveis de AMPc, por meio da ativação da proteína G (GONZALEZ ; CERONI da SILVA, 2006).

2.4 Endocrinologia regida pela ingestão de alimento

O consumo adequado de energia, proteína, vitaminas e minerais é de extrema importância para um bom desempenho reprodutivo (PIRES, 2011).

A nutrição afeta a concentração de hormônios e outros metabólitos relacionados à reprodução por dois tipos de processos fisiológicos distintos: exercendo efeito qualitativo no eixo neuroendócrino, influenciando a fertilidade por meio da síntese e liberação do GnRH, e conseqüentemente, dos hormônios FSH e LH; ou ainda atuando nas gônadas, aumentando a secreção ou potencialização de hormônios e metabólitos (ROBINSON et al., 2006; BOMFIM; ALBUQUERQUE; SOUSA, 2014; GUAN et al., 2016).

Bartke e colaboradores (1999) verificaram que a deficiência na decodificação de GH implica no declínio da performance reprodutiva de machos e alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Sabe-se que o hormônio do crescimento (GH) possui receptores nas células testiculares, podendo agir diretamente nelas (N'DIAYE et al., 2002). Experimentos *in vitro* mostraram que o GH estimulou a secreção de testosterona pelas células de Leydig (MANI MARAN et al., 2000).

Existem evidências de que o hormônio do crescimento (GH) regula o crescimento somático e a diferenciação espermática, afetando a função testicular, por modular a síntese de esteroides gonadais e a gametogênese (ZACHMAN, 1992).

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo que regula várias funções metabólicas, tais como: ingestão, manutenção do balanço energético e reprodução (MAGGIONI, 2008). Ela exerce um efeito trans-sinapse no hipotálamo, por meio de neuropeptídeos Y (NPY), sobre a regulação do LH e da somatotropina

(WILLIAMS et al., 2002). O NPY é um potente estimulador de consumo e inibidor da secreção de gonadotrofinas. Sendo assim, o NPY por estar diretamente envolvido com os neurônios que secretam o GnRH, atua inibindo a secreção de LH (PARENT; BOURGUIGNON, 2000).

A administração intravenosa de GH e NPY tende a aumentar a síntese de leptina, que por sua vez, provoca um mecanismo de feedback negativo sobre seus receptores no hipotálamo, diminuindo a secreção desses hormônios (CHILLIARD et al., 2001; CATUNDA et al., 2014).

De acordo com Barash et al. (1996), a ação da leptina sobre a reprodução pode se dar de duas formas: direta, quando ela age sobre as gônadas promovendo o aumento na produção de esteroides sexuais, e indireta, por meio da sua ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, cuja função é informativa sobre o estado nutricional do indivíduo.

A leptina interage ativamente em outros dois sistemas endócrinos envolvidos no controle reprodutivo: pancreático - insulina (ZIEBA et al., 2003) e GH- hipófise (HENRY et al., 2001). A correlação com a insulina forma alças reflexas em que a insulina promove a secreção de leptina e a leptina sérica reduz a produção da insulina (TAVARES, 2014).

A insulina é considerada um dos principais hormônios metabólicos relacionado à reprodução (BLACHE; ADAM; MARTIN, 2002). No hipotálamo, são encontrados receptores de insulina (BLACHE; ADAM; MARTIN, 2002).

O aumento do subsídio dietético eleva as concentrações de insulina no plasma e no fluído cefaloraquidiano (MILLER et al., 1995; ZHANG et al., 2005a; ZHANG et al., 2005b). Quando a concentração de insulina no cérebro é elevada, há diminuição da expressão hipotalâmica dos neuropeptídeos orexigênicos, peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) e neuropeptídeo-Y (NPY), esses acontecimentos são associados à estimulação de secreção de GnRH, e em consequência, aumento nas taxas de secreção de FSH e secreção pulsátil de LH (MILLER et al., 2007).

Quando ocorre o aumento do status energético, por consequência, os níveis de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) serão elevados no plasma sanguíneo de bovinos. Este último é produzido principalmente pelo fígado, porém os testículos também são capazes de secreta-lo (SELVARAJU et al., 2009).

O IGF-I é um importante sinal hormonal que influencia os eventos reprodutivos como a mitogênese celular e produção hormonal (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995).

Ele é associado com o aumento precoce de LH, potencializando o efeito gonadotrófico, agindo como um mensageiro do estado nutricional ao hipotálamo e/ou por afetar diretamente a células somáticas dos testículos (DANCE et al., 2015).

A ação da leptina, insulina, IGF-I e GH no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonal estão ilustrados na figura 3.

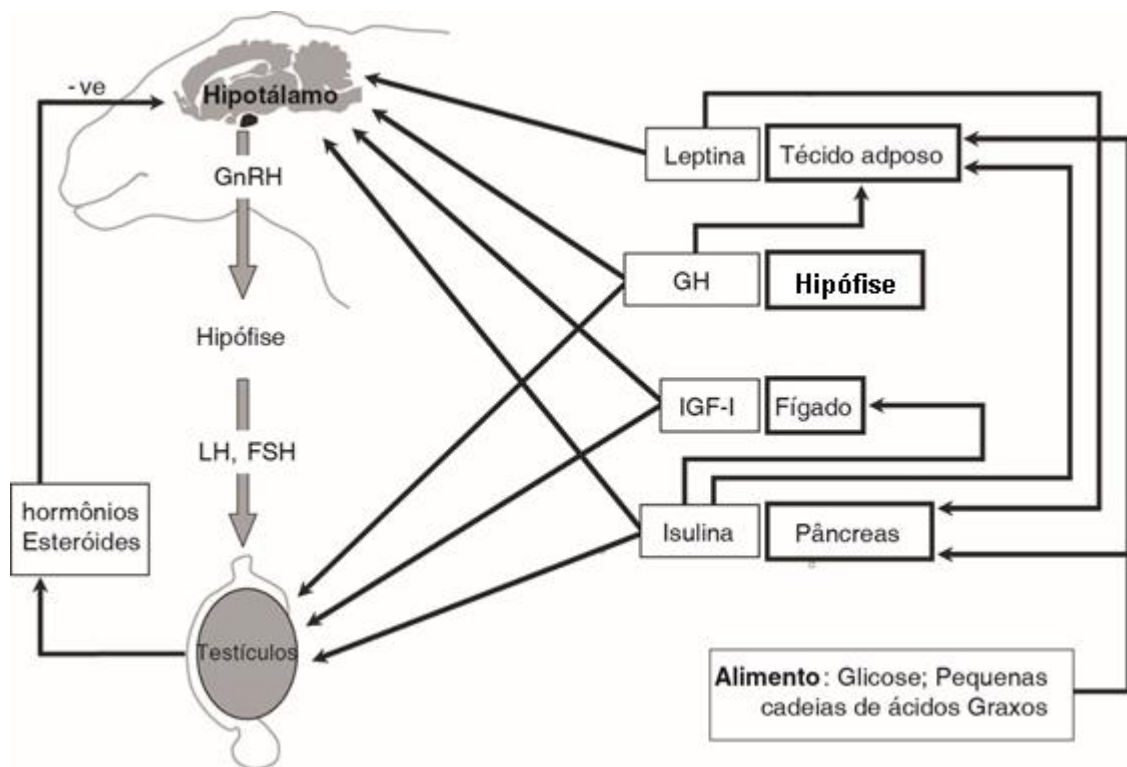


Figura 3: Resumo da ação de hormônios influenciados pela dieta no controle endócrino do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonal. A insulina produzida pelo pâncreas participa estimulando a produção de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) pelo fígado, sua presença afeta a concentração circulante de leptina. O GH (hormônio de crescimento) é produzido pela hipófise e atua no tecido adiposo estimulando a produção de leptina. Todos esses hormônios influenciam o hipotálamo a produzir e secretar o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) desencadeando a cascata hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonal. Exceto pela leptina, todos os outros hormônios também agem diretamente nos testículos produzindo hormônios esteróides, que realizam o feedback negativo no hipotálamo.

FONTE: adaptado de Martin, Blache, Miller e Vercoe, (2009)

2.5 Exigência Nutricional dos Bovinos

O estudo das exigências nutricionais de bovinos no Brasil tem envolvido, principalmente, a determinação dos requerimentos de energia, proteína, macrominerais e, em menor intensidade, de aminoácidos, bem como a eficiência de

utilização da energia para manutenção e ganho de peso (FONTES, 1995). A espermatogênese é influenciada pelo estado de nutrição. No período de crescimento, as deficiências alimentares atrasam o desenvolvimento do aparelho genital e o início da puberdade (MARTIN et al., 2010).

Para bom desenvolvimento do touro, a dieta deve ter energia e teor de proteínas adequados, além de correta suplementação mineral. Estudos têm demonstrado que a espermatogênese em bovinos é sensível ao aumento de ingestão de proteínas. A produção de sêmen, bem como o número total de espermatozoides por ejaculação, pode ser influenciada pelo aumento do consumo de alimentos energéticos (TUFARELLI et al., 2011).

Curasson (1949/1950) *apud* Prada (2005) cita que a carência quantitativa de proteínas e, principalmente, no que se refere aos aminoácidos, como a lisina e o triptofano, provoca a formação de espermatozoides anormais, diminuindo a sua motilidade, atingindo, às vezes, até a azoospermia.

A situação metabólica favorável em animais com maior consumo de energia aumenta os níveis de glicose, insulina e IGF-I, estimulando a secreção de GnRH, o que por sua vez aumenta a síntese e liberação de LH (SCHILLO, 1992).

Quando a ingestão de energia é restrita, o desenvolvimento testicular diminui e a produção espermática pode ser reduzida, sendo que deficiências prolongadas de nutrientes essenciais podem provocar infertilidade. Por outro lado, uma alimentação excessiva pode tornar os reprodutores obesos e indolentes, e também nesse caso, com reflexos negativos nas taxas reprodutivas do animal (EMBRAPA, 2008; CHACUR et al., 2010; KASTELIC, 2014; CUNHA et al., 2015).

2.6 Suplementação Proteico/Energética

Nas condições climáticas brasileiras, a oferta de forragem é sazonal, sendo assim, nas épocas mais secas do ano (período de dias mais curtos), a disponibilidade de forragem é baixa, comprometendo o consumo mínimo para manutenção das condições orgânicas de animais criados em regime de pastejo (NEIVA, 2000).

A quantidade de energia disponível para a reprodução depende da diferença entre a quantidade de energia gasta, incluindo as exigências para manutenção e o conjunto de energia produzida. A energia disponível inclui a energia derivada da ingestão de alimentos, mais a energia armazenada no organismo, especialmente no

tecido adiposo, fígado e músculo (SCHILLO, 1992). Quando há baixa oferta de nutrientes, as funções não vitais ao organismo, produção e reprodução, são as primeiras a serem debilitadas.

A desnutrição pode, dessa forma, atrasar o desenvolvimento da maturidade sexual, causando danos à produção de espermatozoides e à manifestação da libido (MAYNARD, 1984).

A subnutrição afeta o mecanismo endócrino, diminuindo a secreção do LH e a resposta da testosterona ao GnRH, alterando a funcionalidade testicular (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A queda de peso vivo e testicular, no período da seca, pode refletir na taxa de fertilidade da próxima estação, uma vez que se exige do touro cerca de no mínimo quatro meses para se recuperar, em pastagem de boa qualidade (SILVA, 2002; SANTOS, MELO e PALES, 2005; BARTH, BRITO, KASTELIC, 2008; DIAS et al., 2014).

Dessa forma, a utilização de suplementação é uma ótima alternativa para evitar perdas da produtividade, tanto na pecuária de leite quanto na de corte, principalmente em criações extensivas durante a estação de seca (SUSIN, 1996).

A oferta de suplementação durante a estação reprodutiva resultou em aumento das concentrações séricas de colesterol (GRESSLER et al., 2015), ganho de peso (DANCE et al., 2015; GRESSLER et al., 2015; GOTTARDI et al., 2014; GUAN et al., 2014; TUFARELLI et al., 2011) e aumento do escore de condição corporal (ECC), levando a padronização do rebanho e conseqüentemente, melhor desempenho reprodutivo (GOTTARDI et al., 2014) em bodes, carneiros e touros.

Em animais com acesso a suplementação proteico/energético, foi observado aumento do volume do ejaculado (GUAN et al., 2014; TUFARELLI et al., 2011), maior número de espermatozoides por ejaculado (GUAN et al., 2014b), integridade funcional na membrana plasmática aumentada (SELVARAJUA et al., 2012), intensificação da velocidade curvilínea, retilínea e total dos espermatozoides, sendo essa característica relacionada ao sucesso da prenhez (GUAN et al., 2014; SELVARAJUA et al., 2012; TUFARELLI et al., 2011).

Touros suplementados tiveram frequência de pulsos de LH mais precocemente e atingiram um pico de maior magnitude, além de concentração mais elevada de testosterona, compreendendo uma maior resposta ao GnRH e elevado nível de IGF-I do que nos touros que não receberam a dieta (DANCE et al., 2015).

2.7 Puberdade e Maturidade Sexual

Denomina-se puberdade a junção gradativa entre as atividades gonadotróficas em crescimento e a capacidade das gônadas de apresentar simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese (HAFEZ, HAFEZ, 2004). Durante esse período, ocorre o crescimento dos testículos, associados a alterações nos padrões de liberação de LH e elevação da testosterona plasmática, além de início da espermatogênese (BALL; PETERS, 2006) e aparecimento dos primeiros sinais de interesse sexual (SALLES, 1995).

Por definição, o início da puberdade é determinado como a idade em que se obtém o primeiro ejaculado com 10% de motilidade progressiva e 50 milhões de espermatozoides totais em bovinos machos (GUIMARÃES, 1999; WOLF; ALMQUIST; HALE, 1965).

O incremento da qualidade seminal também é característica desse processo, como o aumento de volume do ejaculado e da concentração espermática, melhoria na motilidade espermática progressiva e vigor. Assim como, o decréscimo das patologias espermáticas (FRENEAU, 1991).

Uma série de fatores possui influência na determinação da idade de início da puberdade, como: peso, raça, níveis nutricionais, interferências climáticas e relações sociais. O início da puberdade está mais intimamente relacionado ao peso do que a idade. Por exemplo, bovinos atingem a puberdade quando seu peso corpóreo compreende cerca de 40% a 50% do seu peso adulto (HAFEZ, 2004).

A condição nutricional relaciona-se com o peso, de forma que uma alimentação deficiente pode causar supressão da atividade hormonal, retardando o desenvolvimento do animal, a produção de espermatozoides e conseqüentemente, um atraso à puberdade (CHACÓN; PÉREZ; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2002; HAFEZ, HAFEZ, 2004; MARTIN et al., 2010).

Touros com boa nutrição têm a frequência e magnitude de pulsos de LH mais precocemente que aqueles submetidos à restrição alimentar, elevando dessa forma a concentração de testosterona. Inferiu-se que o IGF-I se relaciona com a regulação do aumento precoce de LH, potencializando o efeito gonadotrófico, agindo como um mensageiro do estado nutricional ao hipotálamo (DANCE et al., 2015).

Em relação à raça, touros com genótipos taurinos são mais precoces, manifestando a puberdade completa com indicadores seminais adequados em idade inferior que de touros com genótipos zebuínos (MORAES, 2012). Estudos têm demonstrado que os touros de raças zebuínas atingem a puberdade em torno de 25 a 28 meses de idade, sendo muito elevada em comparação aos taurinos, que em média, atingem a puberdade entre 12 a 14 meses de idade, quando criados em condições de trópicos (GUIMARÃES et al., 2011).

Ainda há relatos de que os defeitos espermáticos totais na puberdade de *Bos taurus* e touros cruzados (WILDEUS; HOLROYD; ENTWISTLE, 1984) são mais elevados que em *Bos Indicus*, em que os defeitos compreendem em média 15% de espermatozoides totais, enquanto os primeiros puderam chegar a 60%. A principal anormalidade espermática observada na puberdade foi a gota citoplasmática proximal (TROCÓNIZ et al., 1991).

Além do genótipo, o ambiente tem um grande efeito sobre a idade na puberdade, touros Angus e Hereford criados na Florida, região subtropical (CHASE et al., 1997) e touros Holstein e Brown-suíço, produzidos em região tropical como o México (JIMÉNEZ-SEVERIANO, 2002), chegaram a puberdade com idade mais avançada que animais de mesma raças criadas em regiões temperadas (PRUITT et al., 1986). Animais taurinos criados em condições de clima temperado, podem chegar à puberdade com 8 a 10 meses de idade (GUIMARÃES et al., 2011).

A maturidade sexual nos touros ocorre, normalmente, 16 a 20 semanas após a puberdade (LUNSTRA; ECHTERNKAMP, 1982). Nessa ocasião, o aumento na concentração espermática ocorre em função do aumento do comprimento dos túbulos seminíferos (CARDOSO, 1977).

A maturidade sexual é alcançada quando o crescimento das gônadas e corporal, juntamente com concentrações de testosterona e desenvolvimento sexual, estabiliza-se. A maioria dos estudos preconiza que os animais atinjam a maturidade sexual quando possui no mínimo, 500×10^6 espermatozoides com 50% de motilidade espermática progressiva, e morfologia espermática com no máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores (ECHTERNKAMP, 1982; VALE FILHO, 1997; GUIMARÃES et al., 2011; LUNSTRA; MORAES, 2012).

Normalmente, os animais de raças zebuínas são extremamente tardios com relação à maturidade sexual, atingindo-a somente aos 30 a 36 meses de idade quando criados em manejo extensivo. Assim como na puberdade, essa característica é

altamente influenciada pela nutrição e condições climáticas, sendo assim, sob condições ambientais de trópicos, o gado zebuino pode ser tão precoce quanto os taurinos, desde que submetidos ao necessário para que possam expressar todo potencial genético (GUIMARÃES et al., 2011).

2.8 Exame andrológico

O exame andrológico é imprescindível para sucesso da pecuária, visto que o bom desempenho reprodutivo é a base essencial de criações lucrativas. Além disso, o reprodutor possui o papel de transmitir a seus produtos parte do seu material genético, contribuindo para a fertilidade e características desejadas do rebanho (SILVA, 2002).

Esse exame baseia-se em classificar fatores, que de alguma forma podem influenciar nas funções reprodutivas do touro. Fundamentalmente são avaliados, características do animal e do sêmen. Inicialmente, é realizada a identificação do animal, anamnese, exame clínico geral dando ênfase no aparelho locomotor, seguido do exame clínico e físico do aparelho reprodutivo, comportamento sexual, aliado ao espermograma (BARTH, 2008; CHENOWETH, 2011).

2.8.1 Avaliação do aparelho reprodutivo

O exame realizado nas glândulas sexuais acessórias pode ser feito por meio de palpação retal associada ou não a ultrassonografia trans-retal (CBRA, 2013), de forma que a próstata e as glândulas bulbouretrais dificilmente apresentam alterações importantes, salvo em poucos casos de processos inflamatórios (VAN CAMP, 1997). Além da próstata e glândula bulbouretral, deve-se avaliar a vesícula seminal observando se a mesma possui aumento de volume, perda das lobulações e sensibilidade ao toque, uma vez que seu comprometimento afeta a qualidade seminal com redução de seu desempenho (GALLOWAY, 1974).

O pênis, o prepúcio e o cordão espermático são avaliados quanto a presença de aderência, possíveis lesões, aumento de volume ou inchaço, sensibilidade a dor e possível presença de ectoparasitas. A bolsa escrotal, os testículos e o epidídimo, devem ser avaliados quanto à consistência, simetria, mobilidade e temperatura, de forma que seja notória qualquer alteração, como presença de aderência, lesões,

ectoparasitas, processos inflamatórios e qualquer achado que possa comprometer a sanidade do órgão (CBRA, 2013).

2.8.1.1 Perímetro escrotal

A mensuração do perímetro escrotal tem se tornado uma importante aferição em exames andrológicos, visto que estudos indicam correlação direta entre a circunferência escrotal com a precocidade sexual e fertilidade do touro (DIAS et al., 2008; KEALEY et al., 2006; PINEDA; FONSECA; PROENCA, 2000).

Além disso, a quantidade de parênquima testicular está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade espermática (CATES, 1975), assim como a produção de andrógenos (VIU et al., 2006).

Para que os diversos estudos sejam comparáveis, recomenda-se que a aferição da circunferência escrotal, utilizando fita métrica, deverá ser realizada medindo a região da bolsa escrotal no seu maior diâmetro (PINEDA; FONSECA; PROENCA, 2000).

O perímetro escrotal possui herdabilidade de moderada a alta, e é correlacionado com o ganho de peso ao nascimento, peso ao desmame e ganho de peso ao ano (SIQUEIRA; GUIMARÃES; PINHO, 2013). Além do mais, filhas de reprodutores com circunferência escrotal considerável devem atingir a puberdade mais precocemente (CATES, 1975).

A circunferência escrotal varia conforme idade e raça. Dessa forma, encontramos na literatura tabelas em que são descritas a circunferência esperada em cada idade do touro para cada grupo racial. Por exemplo, para *Bos taurus taurus*, classifica-se aos 12-14 meses de idade, perímetros menores 30 cm questionáveis, sendo classificado muito bons touros com mínimo de 35 cm. Já para animais acima de 30 meses, um perímetro menor que 33 cm torna o touro questionável, de forma que para receber a nota de muito bom precisará ter no mínimo 40 cm de circunferência (BEEF IMPROVEMENT FEDERATION, 1994).

Fonseca e colaboradores (1997), descreveram que animais *Bos taurus indicus* que possuem circunferência escrotal inferior a 17,5 cm entre 7 a 12 meses de idade são classificados como questionáveis, enquanto que maior que 21 cm os tornam muito bons. Segundo os autores, o touro adulto (com 60 meses de idade) que possuir o

mínimo de 38 cm de circunferência escrotal será classificado como muito bom, e inferior a 33 cm, terá classificação questionável.

2.8.2 Avaliação seminal e espermática

2.8.2.1 Coleta de sêmen

É necessário que a coleta do sêmen seja realizada respeitando o método de eleição de cada espécie, para que sejam avaliados o ejaculado e os espermatozoides do touro. Os métodos indicados para espécie bovina são: massagem da ampola, vagina artificial e eletro-ejaculador (CBRA, 2013).

No método de massagem da ampola, é feita a massagem manual das glândulas vesiculares e das ampolas, por meio da via retal do animal, com a mão enluvada. Esse método não é preferencialmente empregado a campo, sendo utilizado somente quando os reprodutores não estão condicionados a vagina artificial ou há indisponibilidade do eletroejaculador na propriedade (REICHENBACH; MORAES; NEVES, 2008).

A vagina artificial foi criada com o intuito de simular o aparelho genital feminino, sendo necessária a utilização de uma fêmea em estro ou manequins (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). Seu tamanho pode variar de acordo com a faixa etária do touro a ser coletado, podendo ser 26 cm para jovens e 30-40 cm para adultos, e a temperatura interna deve permanecer entre 40 e 42°C no momento da coleta (DERIVAUX, 1980).

O método de escolha para coleta de sêmen em animais de produção é realizado por meio do eletroejaculador, quando muitos animais são coletados. Essa técnica consiste na indução da ejaculação por meio de estímulos elétricos ao nível da quarta vértebra lombar (REICHENBACH; MORAES; NEVES, 2008). O animal deve ser contido em um tronco, de forma a evitar ao máximo os movimentos, e as fezes retiradas manualmente do reto para que se tenha melhor condução elétrica. A probe então é introduzida no reto após a lubrificação com vaselina, sendo que a voltagem é aumentada de forma gradativa com períodos de estimulação rítmica repetidas vezes, passando por períodos de descanso de 5 segundos aproximadamente (DERIVAUX, 1980). Após ser realizada a coleta de sêmen, o mesmo deve ser avaliado quanto as suas características macroscópicas e microscópicas.

2.8.2.2 Características Macroscópicas

As avaliações macroscópicas do ejaculado são realizadas a olho nu e imediatamente após a coleta, de forma que é observado o aspecto, odor, cor e volume (CBRA, 2013).

A aparência ou aspecto do sêmen possui correlação com a concentração, variando de cremosa, onde se espera cerca de 1 milhão de espermatozoides/mL, leitosa, opalescente e aquosa ou translúcida, da qual pode apresentar concentração inferior a 200 mil espermatozoides/mL, por exemplo (ZEMJANIS, 1970).

O odor natural do sêmen é caracterizado como “*sui generis*”, e é proveniente do fosfato de espermina, que possui a função de tamponar o pH ácido da vagina (MIES FILHO, 1982). Odores cítrico e pútrido podem ser devido à contaminação por urina e presença de bactérias, respectivamente (MANN; LUTWAK-MANN, 2012).

Dentro da normalidade, a cor pode variar em: esbranquiçada, branca, marfim ou amarelada (CBRA, 2013), sendo essa última devido à presença de riboflavinas, secretada pelas glândulas vesiculares (MENDOZA; WHITE; CHOW, 1989). Porém, outras colorações como: avermelhada, marrom e cinza escuro são comuns de serem encontradas e podem ser sugestivos de patologias, indicando presença de hemácias, sangue hemolisado e sujeiras, respectivamente (CBRA, 2013).

Segundo CBRA (2013), o volume é dado em mililitros (mL), podendo variar conforme a espécie, método de coleta e variações raciais. Na espécie bovina, a média do ejaculado é 5 mL para o método de vagina artificial, podendo atingir de 10 a 30 mL, quando usado o eletroejaculador, devido ao estímulo das glândulas sexuais acessórias (DERIVAUX, 1980). Animais de origem zebuína possuem glândulas acessórias anatomicamente maiores, contribuindo com uma expressiva parte do volume seminal, fazendo com que esses animais possam ter maior volume de ejaculado por coleta (REIS, 2013).

2.8.2.3 Características microscópicas

Os aspectos rotineiramente avaliados por meio de microscopia são turbilhonamento ou motilidade em massa, motilidade espermática total, vigor, concentração espermática, e avaliação morfológica dos espermatozoides. A

motilidade em massa é definida como a intensidade de movimentação dos espermatozoides, sofrendo variações em função do vigor, concentração e da motilidade espermática (LOPES et al., 2013). Sua avaliação é feita em escala de 0-5, sendo que zero é a ausência da movimentação em massa, e cinco, a movimentação intensa (CBRA, 2013).

Denomina-se motilidade espermática total o percentual de espermatozoides que se movem em uma amostra de sêmen (0-100%), também pode ser avaliado quanto ao tipo de movimentação, tratando-se de motilidade retilínea progressiva, circular, retrógrado ou estacionário. Sua avaliação pode ser feita de forma subjetiva, utilizando apenas a microscopia óptica e um avaliador treinado ou por meio de sistemas computadorizados, por exemplo, o Sistema de Análise Espermática Computadorizado – CASA (LOPES et al., 2013).

O vigor é classificado de acordo com velocidade que os espermatozoides se deslocam no campo de visualização e o tipo de motilidade, sendo a classificação cinco aquela em que as células se deslocam em alta velocidade e mais de 80% das células móveis apresentam motilidade progressiva; enquanto a classificação um, consiste no deslocamento muito lento dos espermatozoides e predominância de movimento circulatorios, oscilatórios e retrógrados (BARTH; OKO, 1989), e zero, representa células completamente paradas (CBRA, 2013).

A concentração espermática é o número de espermatozoides presentes em um determinado volume do ejaculado. É necessária a dissolução do sêmen em formol salino tamponado ou citrato de sódio formalizado em uma diluição já pré-determinada, podendo ser avaliado por meio de espectrofotômetro ou hemocitômetro que consiste na contagem manual, realizada, por exemplo, com auxílio da câmara de Neubauer (REICHENBACH; MORAES; NEVES, 2008).

Outra avaliação que deve ser realizada é a morfologia espermática, que tem por objetivo quantificar espermatozoides com características normais, e estimar a porcentagem de defeitos morfológicos nas células espermáticas (BLOM, 1950). Na literatura, são descritas diversas formas de agrupar e classificar os defeitos morfológicos encontrados nos espermatozoides, a fim de caracterizar o dano sofrido ao sêmen e as consequências para fecundação.

Existem algumas variações na classificação dos defeitos morfológicos. Por exemplo, Blom (1950) classificou os defeitos em três grupos de acordo com a origem, sendo os defeitos primários aqueles vindos do epitélio seminífero, os secundários, que

podem ter sofrido danos desde o epidídimo até o momento da ejaculação, e finalmente terciários são caracterizados em touros com diagnóstico de degeneração testicular, sendo encontradas hemácias, piócitos e medusas.

Já Saacke (2008) propôs a classificação morfológica em duas categorias: defeitos compensáveis e não compensáveis. Os defeitos compensáveis são aqueles que reduzem a fertilidade por interferirem desde o transporte dos espermatozoides no aparelho reprodutor feminino até o início da fertilização e o bloqueio da polispermia; como defeitos de cauda, peça intermediária ou de cabeça com grandes modificações na sua forma. Enquanto os defeitos não compensáveis, são espermatozoides incapazes de manter o desenvolvimento embrionário, resultando na clivagem tardia ou não reconhecimento materno, são associados a erros na cromatina dos espermatozoides, podendo possuírem cabeças morfológicamente normais ou cabeça sutilmente deformada (FRENEAU, 2011).

A classificação mais utilizada atualmente é a descrita por Blom, (1972), que classificou os defeitos em maiores, sendo patologias mais relacionados com infertilidade e doenças testiculares ou epididimárias; e menores, os defeitos referentes a anomalias de menor impacto na fertilidade. O limite máximo aceito de defeitos totais são 30%, sendo que os maiores não devem ultrapassar 20% (ARRUDA et al., 2015). Segundo ao Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2004), deve-se somar a essa classificação a presenças de medusas, células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, neutrófilos e bactérias.

O mínimo de espermatozoides a ser contado para avaliação da patologia espermática é de 200 células por amostra de sêmen (FRENEAU, 2011). A avaliação da morfologia espermática pode ser realizada por microscopia de contraste de fase ou contraste de interferência diferencial de fase – DIC pelo método de câmara úmida ou sob e esfregaço corado com eosina-nigrosina, hematoxilina-eosina, giemsa ou rosa de bengala sob microscopia óptica de campo claro (FRENEAU, 2011).

Na figura 4 estão listados os defeitos espermáticos mais comuns em bovinos, classificados pela região anatômica do próprio espermatozoide.

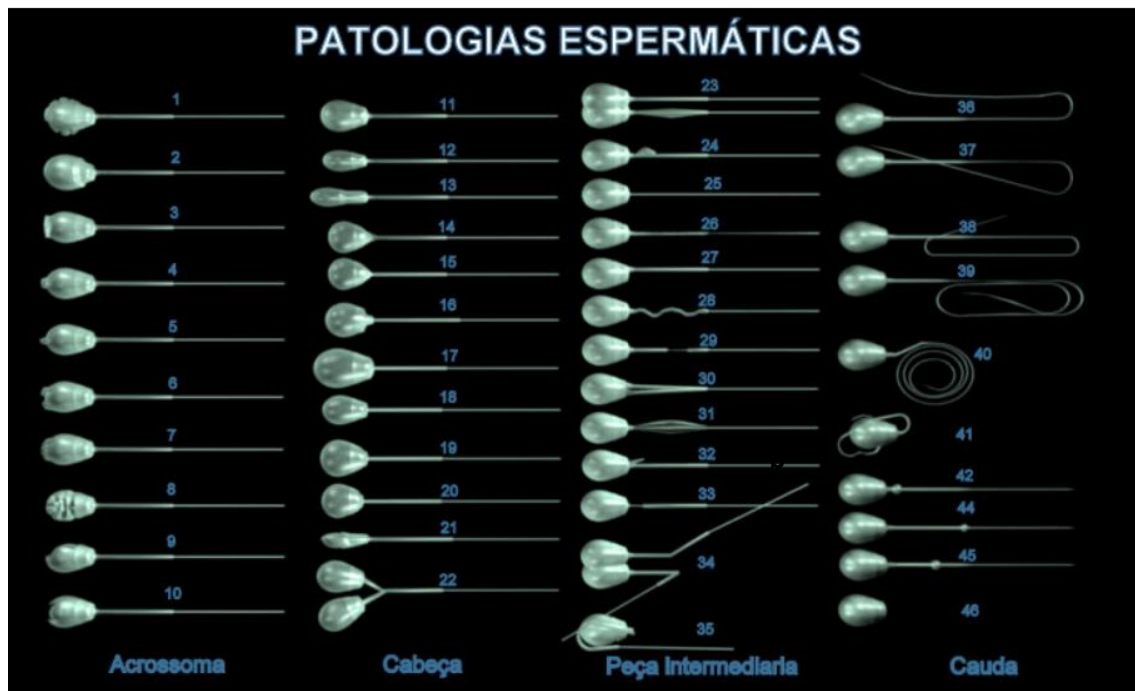


Figura 4: Patologias espermáticas listadas conforme a região anatômica do espermatozoide: 1 a 10. Defeitos de acrossoma - 1. Afrouxado; 2. Inchado; 3. Dobrado; 4-7. Knobbed (4. Elevado; 5. em ponta; 6. duas pontas; 7. achatado); 8. Enrugado; 9-10. Incompleto. 11 a 22. Defeitos relacionados a cabeça - 11. Normal; 12. Delgada; 13. Alongada; 14 e 15. Delgada na base; 16. Piriforme; 17 e 19. Grande; 18. Pequena normal; 20. Arredondada; 21. Pequena patológica; 22. Cabeças duplas. 23 a 35. Defeitos de peça intermediária - 23 Grossas; 24. Pseudogota; 25. Filiforme; 26. Mordida; 27. Implantação abaxial; 28. Saca-rolha; 29 e 33. Desassociada ou com aplasia segmentar; 30. Dupla; 31. Dividida; 32. Desdobrada; 34. Quebradas, 35. Dobrada na cabeça. 36 a 41. Defeitos de Cauda – 36 e 37. Cauda dobrada simples; 38. Caudas enroladas simples; 39 e 40. Fortemente enrolada ou dobrada; 41. Cauda e peça intermediária enrolada na cabeça; 42. Gota citoplasmática proximal; 44 e 45. Gota citoplasmática distal; 46. Cabeça isolada normal ou decapitada.
 FONTE: FRENEAU (2011).

2.8.3 Testes complementares

Diversos testes complementares foram desenvolvidos visando melhorar avaliação da fertilidade de touros. Cada técnica está relacionada com diferentes aspectos da qualidade seminal. Tais análises compreendem avaliar a integridade da membrana plasmática, do acrossoma, das mitocôndrias (localizadas na peça intermediária), DNA, identificação da expressão proteica dos espermatozoides (PEÑA ALFARO, 2011).

Os testes mais comumente utilizados são o teste hiposmótico e de termorresistência, devido simplicidade de se realizar a técnica, podendo ser usada a nível de campo, e a sua relação positiva com o impacto na fertilidade (CBRA, 2013).

2.8.3.1 Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico é utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular. Essa técnica caracteriza-se pelo transporte de fluidos através da membrana plasmática intacta dos sob solução hiposmóticas, até o equilíbrio entre os compartimentos. Devido o influxo de água ocorre um inchaço esperado das membranas, que leva as fibras da cauda se dobram e enrolam (JEYENDRAN et al., 1984; STRÖM; ROTA; LINDE-FORSBERG, 1997; CBRA, 2013).

Quando o espermatozoide apresenta membrana plasmática lesada o equilíbrio osmótico se estabelece muito rápido, portanto sem aumento do volume celular, conservando a cauda no seu estado natural (CBRA, 2013).

2.8.3.2 Teste de Termorresistência

De acordo com Henry e Neves (1998), o sêmen bovino é de boa qualidade quando, depois de submetido ao teste de termorresistência (TTR), apresenta pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e três (escala de 1 a 5) de vigor espermático. No caso dos bovinos, a grande aceitação do TTR decorreu de sua relação positiva e alta com a fertilidade a campo, confirmada pela taxa de prenhez aos 60 e 90 dias, com a relação de $0,78 \pm 0,04$ (DIMITROPOULOS, 1972).

Algumas variações relacionadas ao tempo de incubação e à temperatura em que são submetidos as amostras de sêmen são encontradas na literatura. No TTR lento, as amostras de sêmen são incubadas a uma temperatura de 38°C (temperatura fisiológica) por um período de cinco horas (DIMITROPOULOS, 1972).

Na forma rápida do TTR, o sêmen é mantido a uma temperatura de 46 °C pelo prazo de 30 minutos (MIES FILHO, 1987). Entretanto, Cunha et al., (2012) indica uma incubação a 37 °C por três horas, avaliando a cada 30 ou 60 minutos (BARNABE;

BARNABE; VISITIN, 1981; VOGLER et al., 1991) por reproduzir condições mais similares ao trato reprodutivo da fêmea.

2.9 Libido

Entende-se por libido a habilidade do animal em comprovar interesse sexual, demonstrando empenho na realização da monta e na tentativa de completar a cobertura (CHENOWETH, 1983; HAFEZ e HAFEZ, 1995). As etapas componentes da conduta sexual em mamíferos são manifestadas pelo despertar sexual acompanhado pelo cortejo, ereção, protrusão do pênis, monta, cópula ou introdução, ejaculação, desmonta e a saciedade (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Diversos fatores como raça, idade, hierarquia e a relação touro/vacas, podem afetar a expressão da libido a campo (COULTER; KOZUB, 1989; PETHERICK, 2005).

Frente à diversidade racial, é notado que bovinos de origem europeia realizam a monta em menor tempo, 5-10 minutos (CHENOWETH, 1980), do que touros zebuínos, que em média necessitam de maior tempo, cerca de 20 a 30 minutos (SILVA et al., 1987).

A idade relaciona-se com a hierarquia, uma vez que touros maduros e mais fortes normalmente exercem dominância sobre touros jovens, fazendo com que estes tenham o número de montas e serviços completos reduzidos quando se comparado ao dominante (BLOCKY, 1979; FORDYCE et al., 2002).

É de suma importância a estimativa do comportamento sexual dos touros, uma vez que essa característica é responsável por causar efeitos positivos na taxa de gestação, influenciando diretamente toda uma estação reprodutiva (CHENOWETH, 1983; HAFEZ; HAFEZ, 1995).

Os testes criados com o intuito de avaliar a libido, destacam formas de qualificar e principalmente quantificar o desejo e a capacidade sexual, de forma a atribuir classificação aos reprodutores (SANTOS, 2001). O teste de avaliação da libido leva em consideração as atitudes tomadas pelo touro frente à fêmea, pontuando de acordo com escalas, que variavam de acordo com o autor.

Osborne et al. (1971) descreve uma escala de 0 (nenhum interesse pela fêmea) até 4 (monta e cópula). Já Chenoweth (1977), classifica o interesse sexual até 10, em que o touro realiza dois ou mais serviços completos seguidos por interesse sexual, incluindo montas, tentativas de monta e novos serviços completos. Há ainda testes

que quantificam o comportamento sexual utilizando a relação entre a conduta do touro (coberturas) e o tempo gasto pelo animal para exercer tais ações (BLOCKKEY, 1976).

Como os primeiros testes foram idealizados para touros "*Bos taurus taurus*", não foi levando em conta a diversidades raciais já mencionadas, portanto, não se provaram eficientes para reprodutores zebuínos. Em trabalho realizado, Chenoweth (1983), foi observado que, apesar de ter boa libido, touros da raça Nelore se intimidam diante de testes realizados em curral, comprometendo a avaliação do reprodutor. Além disso, testes realizados com mais de um touro ao mesmo tempo podem influenciar os resultados devido à hierarquia social do grupo, uma vez que alguns indivíduos não demonstram seu total potencial por serem submissos a touros "dominadores" (CRUDELI; FONSECA, 1989).

Após modificações do teste de libido desenvolvido por Chenoweth (1974), Pineda e colaboradores (1997), atribuíram melhor performance a zebuínos frente às fêmeas. Esses autores descrevem uma metodologia em que o touro pode ser pontuado de 0 (animal não demonstra interesse sexual) a 10 (animal efetua duas ou mais montas com serviço completo).

De acordo com estudo de avaliação de comportamento sexual em touros zebuínos, o animal que realizou serviço completo em menor tempo o fez com 17 minutos, concluindo que o tempo de 30 minutos de observação mostrou-se mais eficiente para a realização do teste da libido em curral (OLIVEIRA et al., 2007). Porém, em outro estudo realizado por Filho (2015), o tempo de 15 minutos foi suficiente para avaliar os animais mestiços, no teste de libido em curral.

A figura 5, ilustra o comportamento sexual classificado com "bom" e nota 4 por Pineda (1997).



Figura 5: Monta incompleta com exposição do pênis, nota 04 (entre 0 e 10) e escore “Bom” de acordo com a classificação de Pineda et al., (1997).
Fonte: Arquivo pessoal.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Local e data

O experimento foi realizado no setor de Zootecnia III - Bovinocultura do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) localizado no município de Alegre, extremo sul do Espírito Santo, nas coordenadas geográficas 20° 45' 45" latitude Sul e 41° 27' 27" longitude Oeste. A coleta a campo teve início no dia 14 de julho e término no dia 22 de setembro do ano de 2016, compreendendo o período de inverno caracterizado por dias mais curtos, clima seco e temperatura média em torno de 20°C. As análises laboratoriais imediatas foram realizadas no laboratório de campo do IFES e as demais foram processadas e avaliadas no laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e laboratório de Citogenética no setor de Genética e Melhoramento da UFES, campus Alegre.

3.2 Animais e tratamento

No início do experimento (dia 0), 14 touros mestiços, $\frac{3}{4}$ Holandês e Gir, foram pesados e avaliados quanto às condições físicas, escore corporal, aprumos, conformação e estado fisiológico dos testículos e aferidos as circunferências escrotal, saco escrotal, pênis, prepúcio, glândulas anexas, além de comportamento sexual. Todos os animais tiveram o sêmen coletado e classificado de acordo com a qualidade, e então após todos os testes foram descartados dois animais, de acordo com a qualidade seminal e idade.

Assim, foram utilizados 12 bovinos machos, não castrados, hípidos, mestiços $\frac{3}{4}$ de Holandês x Gir, entre 14 e 24 meses de idade (média de 19 meses), com escore corporal 3 (escala de 1 a 5), apresentando peso médio de 324kg \pm 72,0, púberes segundo a classificação realizada Wolf et al. (1965), ou seja, animal que apresenta um ejaculado com 10% de motilidade espermática e concentração espermática com no mínimo de 50 milhões de espermatozoides; e com comprovação de capacidade de monta, pertencentes ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Campus de Alegre.

Os animais foram divididos aleatoriamente e igualmente em dois grupos de seis touros cada, sendo considerado apenas as idades, afim de que os grupos fossem

equivalentes. O grupo de animais tratados recebeu suplementação proteico/energético e o outro grupo foi identificado como controle, sem suplementação.

Ambos os grupos foram mantidos em piquetes similares, com acesso a sombreamento, pastagem de *Brachiaria brizantha*, sal mineral proteínado e água *ad libitum*.

Ao grupo tratado foi oferecido suplementação proteico/energético, o qual era constituído de uma mistura de farelo de soja e grão de milho moído, compreendendo 20% de proteína bruta (DETMANN et al., 2004) e 70% de nutrientes digestíveis totais, possuindo 88,6% de matéria seca na ração. Na quadro 1, encontra-se descrito a composição detalhada da ração utilizada para o flushing.

Quadro 1: Ingredientes e suas quantidades em quilogramas, para o preparo de 100 kg do concentrado fornecido para os touros tratados com suplementação.

COMPOSIÇÃO ALIMENTAR	
INGREDIENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (kg)
Milho Grão 7,92% de PB	64,100
Soja Farelo 45% de PB	33,010
Fosfato Bicalcico	1,380
Sal comum	0,830
Premix Mineral	0,400
Calcário	0,180
Adsorvente de Micotoxina	0,100
TOTAL= 100,00	

PB=Proteína Bruta

O consumo diário de suplemento foi de 1,0% de peso vivo do animal, o que equivale em média 3,5 kg de ração por animal, correspondendo a 35 a 40% da matéria seca consumida (PAULINO et al., 2004). A ração foi oferecida pela manhã do dia 1 ao dia 70, compreendendo o período completo da espermatogênese de touros.

Nos dias 35 (D35) e 70 (D70) do experimento, todos os animais foram novamente pesados e tiveram os testículos aferidos para avaliar a consistência, mobilidade e simetria. A circunferência escrotal foi novamente aferido, para isso os testículos foram tracionados para porção inferior da bolsa escrotal, a leitura em cm foi realizada por fita métrica na região de maior diâmetro testicular, como mostrado na figura 6.



Figura 6: Aferição da circunferência escrotal, feita por fita métrica na altura de maior circunferência dos testículos.

Fonte: Arquivo Pessoal

3.3 Coleta de sêmen

A coleta de sêmen foi realizada semanalmente em todos os animais, no período da manhã, a fim de minimizar o estresse causado por diferenças na temperatura ou incidência solar. Foram realizadas um total 11 coletas de sêmen por animal, totalizando 132 amostras.

Para a coleta, os animais foram conduzidos ao tronco de contenção e tiveram suas fezes removidas do reto por mão enluvada para melhor condução dos estímulos elétricos. Posteriormente, os pelos da genitália foram aparados com auxílio de uma tesoura minimizando a contaminação da amostra por sujidades. O pênis juntamente com prepúcio foram lavados com solução fisiológica e devidamente secos com papel toalha.

As coletas do sêmen foram realizadas por meio de eletroejaculador (TK800) de estímulo manual por um auxiliar técnico treinado. A probe foi introduzida no reto do

animal após a lubrificação com mucilagem e se iniciou uma estimulação gradativa e rítmica, com duração de 3 minutos passando por períodos de estímulo e descanso.

Os primeiros jatos do ejaculado foram desprezados e o restante coletados utilizando-se funil acoplado a um tubo falcon de 15 mL, protegidos da luz solar com papel laminado. Os ejaculados foram levados para o laboratório a campo no IFES, aonde foram realizadas as avaliações seminal e espermática, e colocados em banho-maria a 37 °C, imediatamente após a coleta.

3.4 Características macroscópicas

Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi classificado de acordo com a cor (esbranquiçada, branca e amarela), odor (*suis generis*), aparência (cremosa, leitosa e aquosa) e volume (mL), sendo essas características avaliadas a olho nu, pelo mesmo avaliador durante todo experimento.

3.5 Características microscópicas

Uma gota de sêmen de 10 a 20 µL foi depositada sobre lâmina previamente aquecida a 37°C, para avaliação do turbilhonamento. A avaliação foi realizada por microscopia óptica no aumento de 100x centralizando-se as bordas da gota. Dessa forma, foi dimensionado a intensidade de movimentação dos espermatozoides, notado por meio de ondas, variando em função do vigor, concentração e da motilidade espermática. Sendo classificados de 0, onde a onda espermática é ausente, até 5, quando a movimentação em ondas é intensa.

Em seguida, outra gota do ejaculado (10 a 20 µL) foi depositada em lâmina aquecida a 37°C e coberta por lamínula, e então levada ao microscópio óptico em aumento de 400x. Foram avaliadas a motilidade espermática total subjetiva e o vigor, concomitantemente. A motilidade total foi classificada em porcentagem (0 a 100%) conforme a proporção de espermatozoides móveis na amostra de sêmen (BARTH; OKO, 1989).

O vigor foi avaliado aferindo-se a intensidade de movimentação individual dos espermatozoides, conforme descrito pelo CBRA (2013), sendo a classificação em escala de 1-5, onde 5 representa aquela em que as células se deslocavam em

velocidade elevada e mais de 80% das células móveis apresentavam motilidade progressiva; enquanto a classificação 1 consistia no deslocamento lento dos espermatozoides e predominância de movimento circulatorios, oscilatórios e retrógrados.

Para análise da concentração espermática, foi necessária diluição de 1:200 em solução de formol-salino a 1 %, sendo pipetado 2 mL de solução formol-salino e adicionado 10 µL de sêmen (BARTH; OKO, 1989). Uma gota dessa solução homogeneizada foi colocada em cada lado da Câmara de Neubauer de forma a cobrir todos os quadrantes. A contagem de células foi realizada sob microscopia óptica em aumento de 400 x, com contagem de 5 quadrantes em cada lado da câmara. O resultado foi estipulado em espermatozoides/mL, de acordo com a fórmula preconizada por CBRA (2013), abaixo:

$$\frac{sptz}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de sptz contados}}{\frac{1}{\text{Diluição}} \times \frac{\text{Quadrados maiores contados}}{25} \times \frac{1}{10}} = n \times 1000$$

O número total dos espermatozoides no ejaculado foi calculado multiplicando-se o volume de ejaculado em mililitro pela concentração espermática. E para determinar o número total de espermatozoides, multiplicou-se o valor encontrado do número total de espermatozoides do ejaculado pelo volume.

Para avaliação da morfologia espermática, em 1 mL solução de formol-salina a 1% (fixadora) foi adicionado sêmen em quantidade necessária para que a solução ficasse turva. Posteriormente, foi avaliada a porcentagem (%) de espermatozoides normais pela técnica de preparação úmida e realizada a leitura em microscópio de contraste de fase, sob imersão com aumento de 1000 X (SCHEID, 1993). Foi realizada a contagem de 200 células.

As características morfológicas dos espermatozoides foram classificadas em defeitos maiores e menores, conforme o quadro 2 (BLOM, 1973) preconizada pelo CBRA (2013).

Quadro 2: Classificação das patologias morfológicas dos espermatozoides, em defeitos maiores e menores, segundo Blom (1973).

Classificação de defeitos espermáticos		
Defeitos Maiores	Acrossoma	Gota citoplasmática proximal afrouxado, inchado, dobrado, knobbed (elevado, em ponta, duas pontas e achatado), enrugado, Incompleto
	Cabeça	subdesenvolvida, piriforme, estreita na base, isolada patológica, pequena anormal e contorno normal
	Peça Intermediária	grossas, pseudogota, filiforme, implantação abaxial, saca-rolha, desassociada ou com aplasia segmentar, quebradas, dobrada na cabeça
	Cauda	fortemente enrolada ou dobrada, enrolada na cabeça ou cauda dobrada com gota distal
Defeitos Menores	Cabeça	Gota citoplasmática distal delgada, gigante, curta, larga, pequena normal, isolada normal
	Cauda	inserção de cauda abaxial, retroaxial, oblíqua; cauda dobrada ou enrolada; gota citoplasmática distal

3.6 Testes complementares

3.6.1 Teste hiposmótico

Para a realização do teste hiposmótico ou teste de funcionalidade da membrana plasmática, foi preparada solução hiposmótica contendo 9 g de frutose, 4,9 g de citrato trissódico e água destilada para 1.000 mL, obtendo-se uma solução de 100 mOsmol/L (REVELL; MRODE, 1994).

Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionado a 1 mL dessa solução e incubada por 30 minutos, em banho-maria a 37 °C, e em seguida adicionados 0,5 mL de solução formol-salina tamponada para fixação das amostras para posterior análise. A análise foi realizada sob microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x

por meio da preparação úmida da amostra. Foram contados 200 espermatozoides por amostra e classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada. O resultado foi apontado em porcentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula: HO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HO) (MELO; HENRY, 1999).

3.6.2 Teste de Termo-resistência

A longevidade dos espermatozoides de cada ejaculado coletado foi avaliada pelo teste de termorresistência lento, de acordo com Vogler et al. (1991). O teste consistiu na incubação das amostras de sêmen em banho-maria a 37 °C por 3 horas. As amostras foram avaliadas quanto à motilidade espermática total (0 a 100%) e ao vigor espermático (0 a 5), no tempo 0 e 180 min, utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400 X.

3.6.3 Avaliação da Libido

O teste de comportamento sexual foi realizado 3, nos dias -1, 34, 69. Para o teste cada animal foi colocado em um curral de 140 m² na presença de duas vacas em estro induzido.

Para realização do protocolo de indução de estro nas vacas, foi utilizado dispositivo intra-vaginal de progesterona introduzido no dia 0, associado à aplicação intramuscular de 2 mL de benzoato de estradiol. No oitavo dia após o início do protocolo, o dispositivo de progesterona foi retirado e realizado a administração intramuscular de 2mL de prostaglandina. No nono dia, foi aplicado 2 mg de benzoato de estradiol para indução do estro, sendo a manifestação de estro observada no décimo dia após o início do protocolo.

Os animais foram observados a distância por dois avaliadores durante 15 minutos (CARRER FILHO ET AL., 2015), onde foram utilizados os principais comportamentos descritos por Pineda et al. (1997) e preconizada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os resultados foram interpretados de acordo com a quadro 3.

Quadro 3: Classificação da libido de acordo com reação do touro exposto por 15 minutos a duas fêmeas em estro, baseado no comportamento descrito por Pineda et al. (1997).

Nota	Conduta sexual	Pontuação
0	Touro não mostrou interesse sexual pela vaca. Apático	Questionável
1	Identificação da vaca no cio (cheirar a vulva)	Questionável
2	Cheirar a vulva da vaca e persegui-la insistentemente	Questionável
3	Intenção de monta sem salto, com mugido, deslocamento ou masturbação	Questionável
4	Tentativa de monta sem o pênis em exposição	Bom
5	Uma tentativa de monta com pênis em exposição	Bom
6	Duas ou mais tentativas de monta com o pênis em exposição	Bom
7	Uma ou mais montas incompletas sem o pênis exposto	Muito Bom
8	Uma ou mais montas incompletas com o pênis exposto	Muito Bom
9	Uma monta completa	Excelente
10	Duas montas completas, seguidas ou não de interesse sexual	Excelente

O tempo de reação dos animais, definido como: tempo em que o animal gasta para identificar a fêmea em estro e apresentar intenção de monta; também foi contabilizada e somada a classificação da conduta sexual. Dessa forma, os animais foram avaliados quanto ao escore tabelado e o tempo (em minutos) gasto para que o touro tenha desempenhado o comportamento sexual.

3.6.4 Concentração de Insulina circulante

Para a coleta de sangue, foi utilizado tubos de vidro, sem anticoagulante. As coletas foram realizadas nos dias 0, 35 e 70, puncionando-se a veia caudal conforme demonstrado na figura 7. As amostras foram armazenadas, em ambiente refrigerado e, posteriormente levadas ao laboratório de reprodução animal onde foram centrifugadas a 700 G (ou 1500 rpm) por 15 minutos para obtenção do soro. O soro foi transferido para eppendorfs devidamente identificados e levados a refrigeração a -80°C até o dia da análise sorológica.



Figura 7: Coleta de sangue realizada através da punção da veia caudal do touro.
FONTE: Arquivo Pessoal.

O soro foi analisado, utilizando conjuntos de reagentes comerciais, desenvolvidos para avaliação quantitativa do hormônio por meio de técnicas imunoenzimáticas.

O teste utilizado para dosagem de insulina foi o teste Elisa direto, em que o anticorpo monoclonal biotilado em quantidade excessiva é colocado em contato com soro bovino (contendo antígenos nativos) e complexo anticorpo-enzima, também em excesso. A reação enzimática ligada à fração de anticorpos ligados é diretamente proporcional à concentração de antígenos livres nativo.

O kit utilizado para dosagem de insulina foi Rapid Insulin AccuBind ELISA Kit, 1x96wells. A sensibilidade do ensaio foi de $0,182\mu\text{UI/mL}$ e os coeficientes de variação intra e enter-ensaio para insulina foram, respectivamente 4,3% e 9,6%. O procedimento para o teste foi realizado de acordo com preconizado pelo fabricante.

3.7 Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para a análise dos dados, foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). As variáveis quantitativas, tempo, volume do ejaculado, motilidade progressiva, hiposmótico, defeitos espermáticos e concentração de insulina foram avaliadas em modelos mistos lineares (*MIXED Procedure*) com medidas repetidas no tempo, com animal como efeito aleatório (LITTELL et al., 2006), e idade como covariável, de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + D_j + (FD)_{ij} + \beta(C_{ij} - \bar{C}_{..}) + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = resposta observada; μ = constante geral; F_i = efeito referente ao tratamento (com ou sem Flushing); D_j = efeito referente ao dia da coleta; $(FD)_{ij}$ = interação; β = efeito linear da covariável (idade); C_{ij} = valor observado da covariável; $\bar{C}_{..}$ = média da covariável; e_{ij} = erro aleatório.

Para a análise do peso corporal e ganho médio diário (GMD), os dados foram avaliados por análise de variância utilizando o peso corporal no dia 0 como covariável, de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + \beta(C_{ij} - \bar{C}_{..}) + e_{ij}$$

E a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey.

Os escores dados para a variável libido foram utilizados para a classificação em questionável, bom, muito bom e excelente. As frequências das classificações foram arranjadas em tabelas de contingência e as associações entre as classificações e os tratamentos foram avaliadas pelo teste exato de Fisher (tabelas 2 x 2) ou teste de Freeman-Halton (tabelas $m \times n$).

Para as variáveis qualitativas vigor e turbilhonamento, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

3.8 Comitê de ética no uso de animais – CEUA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, sob protocolo de número 23149.000715-2016-59, de acordo com os princípios da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas padronizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação física, nos dias 35 e 70 foi observado que os animais pertencentes ao grupo tratado com suplementação tiveram peso superior ($367,2 \pm 27,4$ e $407,4 \pm 27,4$) aos do grupo controle ($343,6 \pm 20,9$ e $352,5 \pm 21,1$) (Gráfico 1). Resultados similares foram descritos na literatura com a utilização de suplementação alimentar durante a estação reprodutiva (TUFARELLI et al., 2011; GOTTARDI et al., 2014; DANCE et al., 2015; GRESSLER et al., 2015; GUAN et al., 2016).

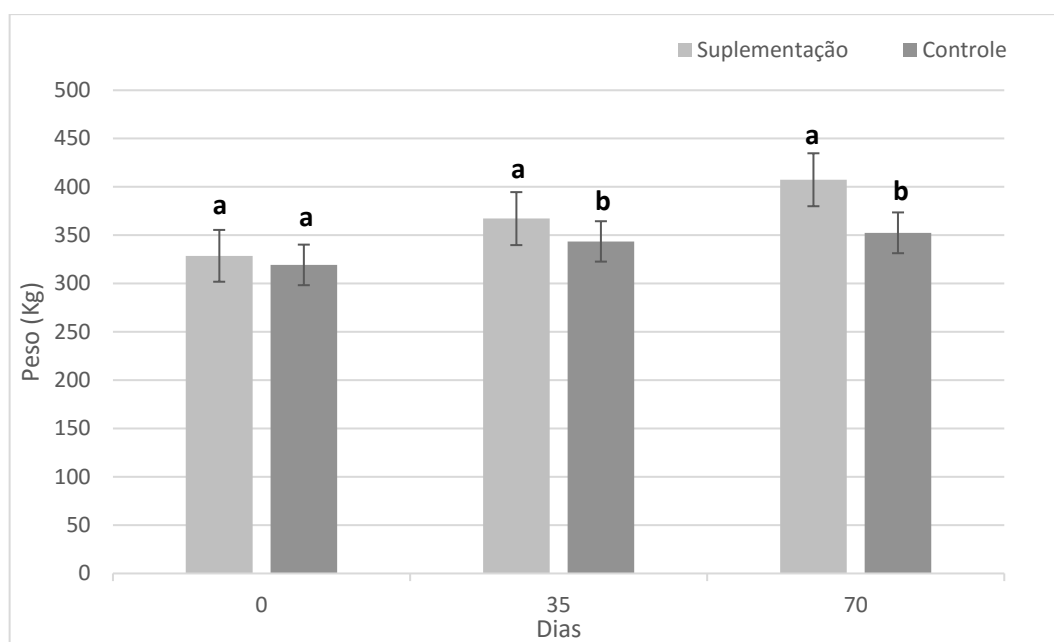


Gráfico 1: Gráfico em barras (médias \pm erro padrão) do peso (kg) avaliados nos dias 0, 35 e 70 de touros, $\frac{3}{4}$ Holandeses x Gir, púberes, recebendo suplementação (n = 6) e não suplementados (controle, n = 6).

a, b Diferença significativa entre os grupos.

A administração da suplementação proteico/energético afetou de forma positiva o ganho médio diário durante todo o tratamento (Gráfico 2), dados que explicam a superioridade em peso dos animais suplementados ao final do tratamento. Esses resultados relacionam-se com o aumento da circunferência escrotal, uma vez que há correlações genéticas altas e favoráveis (0,72) entre as variáveis de peso corporal e perímetro escrotal (SIQUEIRA; GUIMARÃES; PINHO, 2013).

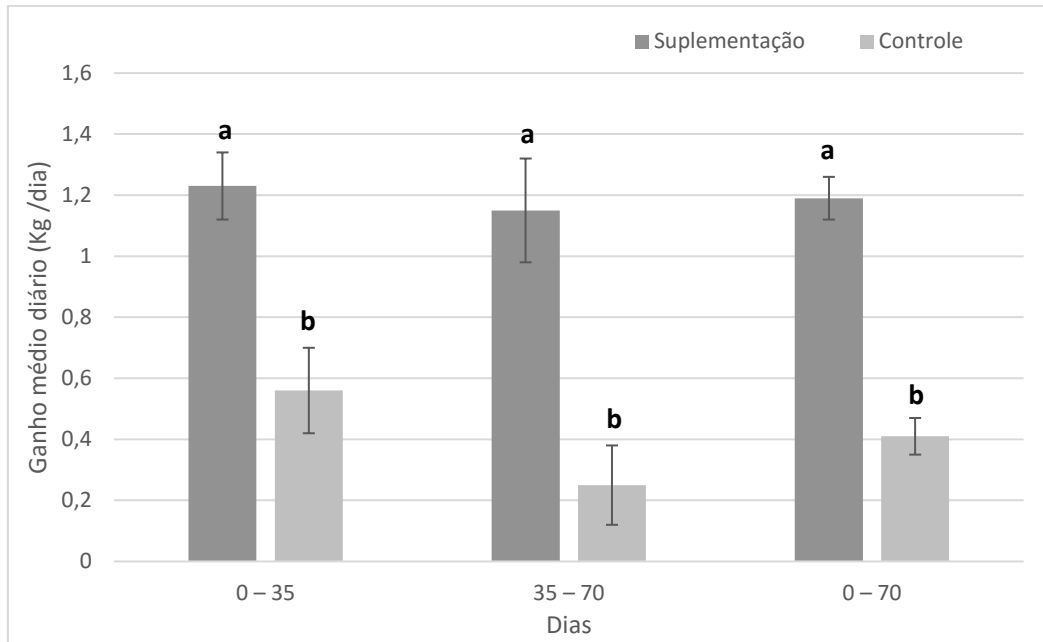


Gráfico 2: Gráfico em barras (médias \pm erro padrão) do ganho médio diário (kg) avaliados nos dias 0, 35 e 70 de touros, $\frac{3}{4}$ Holandes x Gir, púberes, recebendo suplementação (n = 6) e não suplementados (controle, n = 6).

a, b Diferença significativa entre os grupos.

O ganho de peso é relacionado ao melhor desempenho reprodutivo (GOTTARDI et al., 2014) e a idade de entrada na puberdade (CHACÓN; PÉREZ; RODRÍGUEZ -MARTÍNEZ 2002; MARTIN et al., 2010). Segundo Hafez (2004), o peso corporal dos touros possui maior relação com a entrada a puberdade que idade propriamente dita. Sendo assim, animais pesados e com ganho médio diária elevado tendem a serem mais precoces.

Em relação a avaliação das gônadas, todos os animais apresentavam testículos com consistência tenso-elástica, nenhuma sensibilidade à dor, mobilidade dentro da bolsa escrotal e simetria entre os testículos.

Foi detectada diferença ($P \leq 0,05$) na média geral da circunferência escrotal entre o grupo em que os animais receberam a suplementação e o grupo controle, apresentando médias de 32,04 cm \pm 0,87 e 28,93 cm \pm 0,87, respectivamente. Em relação a interação entre dia x tratamento, houve diferença para o dia 70 entre os dois grupos. Além disso, é observado aumento significativo ($P \leq 0,05$) na circunferência escrotal de D0 para os dias 35 e 70 no grupo que recebeu a suplementação, indicando uma melhora em relação ao tempo para animais suplementados (Tabela 1).

Tabela 1: Médias \pm erro-padrão da circunferência escrotal (cm) em função dos dias, em touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandês/Gir, no grupo controle (n=6) e no grupo recebendo suplementação (n=6).

Dias	Circunferência Escrotal (cm)	
	Suplementação	Controle
D0	29,67 \pm 1,09 ^{Ab}	27,58 \pm 0,78 ^{Aa}
D35	32,50 \pm 1,34 ^{Aa}	28,83 \pm 0,87 ^{Aa}
D70	34,67 \pm 1,15 ^{Aa}	29,67 \pm 0,61 ^{Ba}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna ao nível de 5% de probabilidade.

Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na linha ao nível de 5% de probabilidade.

O perímetro escrotal possui alta correlação com herdabilidade genética e com a precocidade sexual e fertilidade do touro (DIAS et al., 2008; KEALEY et al., 2006; PINEDA; FONSECA; PROENCA, 2000), uma vez que a quantidade de tecido testicular está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade espermática (CATES, 1975), assim como a produção de andrógenos (VIU et al., 2006).

Setchell et al., (1965) relataram que o peso testicular reduzido nos animais desnutridos foi acompanhado por uma diminuição no fluxo sanguíneo testicular, consumo de oxigênio e a absorção de glicose. Essas mudanças, em particular, indicam que a atividade metabólica do testículo é influenciada pela ingestão de nutrientes. Além disso, a quantidade de tecido testicular está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade espermática (CATES, 1995).

Não foi notado durante a avaliação física do sêmen coloração e odor que arremettesse a patologias ou contaminação. Sendo assim, todos os animais tinham o sêmen caracterizado com odor “sui generis”.

Durante todo período experimental, os aspectos do sêmen desses animais foram predominantemente de aparência aquosa e de coloração esbranquiçada. O aspecto do sêmen está diretamente relacionado com a concentração dos espermatozoides (DERIVAUX, 1980). Provavelmente, tais características são relacionadas à baixa concentração, fato esperado devido a imaturidade sexual dos touros, uma vez que todos eles se apresentavam na puberdade.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos para volume do ejaculado. Esses resultados discordam com os encontrados por Guan e colaboradores (2014), e Tufarelli et al., (2011) em carneiros, nos quais os animais que receberam suplementação obtiveram aumento no volume do ejaculado.

Uma possível hipótese para tal discordância pode estar relacionada ao uso do eletroejaculador. Apesar de ser o método de coleta de escolha para animais de produção, provoca aumento de volume do ejaculado quando comparado à coleta com vagina artificial (BOPAPE, 2015), devido ao elevado estímulo das glândulas acessórias (DERIVAUX, 1980).

Entretanto, ao se comparar o efeito do tratamento ao longo experimento, foi observado variação ($P < 0,05$) no volume do ejaculado para o grupo suplementado entre o dia 70 e os dias 0, 28 e 63 (Tabela 2).

Tabela 2: Média \pm erro padrão do volume do ejaculado (mL) de touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandês/Gir, em dieta controle (n=6) e recebendo flushing nutricional (n=6).

Dias	Volume (mL)	
	Suplementação	Controle
D0	7,00 \pm 2,70 ^{Ab}	5,17 \pm 1,15 ^{Aa}
D7	9,00 \pm 1,87 ^{Aab}	5,85 \pm 0,60 ^{Aa}
D14	7,62 \pm 0,91 ^{Aab}	9,00 \pm 0,76 ^{Aa}
D21	11,17 \pm 1,60 ^{Aab}	7,18 \pm 1,10 ^{Aa}
D28	5,50 \pm 0,68 ^{Ab}	7,58 \pm 1,23 ^{Aa}
D35	8,42 \pm 1,59 ^{Aab}	7,58 \pm 0,72 ^{Aa}
D42	10,00 \pm 1,19 ^{Aab}	5,67 \pm 0,69 ^{Aa}
D49	9,83 \pm 1,35 ^{Aab}	6,22 \pm 1,08 ^{Aa}
D56	10,48 \pm 2,17 ^{Aab}	6,87 \pm 1,24 ^{Aa}
D63	6,57 \pm 0,78 ^{Ab}	7,10 \pm 1,44 ^{Aa}
D70	15,17 \pm 3,69 ^{Aa}	8,08 \pm 0,91 ^{Aa}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na linha a 5% de probabilidade.

Essa variação de volume ocorrido entre os dias no grupo suplementado pode ser explicada pela sensibilidade da espermatogênese à ingestão de proteínas (TUFARELLI et al., 2011). O experimento ocorreu no período de inverno, compreendendo a época seca do ano, que é caracterizada pela baixa oferta e qualidade nutricional inferior das pastagens. Pode-se considerar que a disponibilização de suplemento proteico-energético possibilitou a um maior consumo de proteínas.

O efeito da suplementação foi significativo ($P < 0,05$) para a avaliação de movimento em massa (turbilhonamento), possuindo médias de 1,31 \pm 0,25 no grupo suplementado, e 0,46 \pm 0,25 no grupo controle. Houve interação significativa entre tratamento e o tempo, no grupo dos animais suplementados observou-se diferença entre o dia 63 e os dias 36, 14 e 0 (Tabela 3).

Tabela 3: Média \pm erro-padrão do movimento de massa (turbilhonamento - 0 a 5), de touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandeses/Gir, em dienta controle (n=6) e recebendo flushing nutricional (n=6).

Dias	Turbilhonamento (0-5)	
	Suplementação	Controle
D0	0,50 \pm 0,34 ^{Ab}	0,00 \pm 0,00 ^{Aa}
D7	1,33 \pm 0,56 ^{Aab}	0,00 \pm 0,00 ^{Aa}
D14	0,50 \pm 0,50 ^{Ab}	0,59 \pm 0,34 ^{Aa}
D21	2,00 \pm 0,58 ^{Aab}	0,50 \pm 0,22 ^{Aa}
D28	1,00 \pm 0,45 ^{Aab}	0,50 \pm 0,22 ^{Aa}
D35	0,50 \pm 0,22 ^{Ab}	0,33 \pm 0,33 ^{Aa}
D42	1,83 \pm 0,48 ^{Aab}	0,33 \pm 0,21 ^{Aa}
D49	1,33 \pm 0,33 ^{Aab}	0,33 \pm 0,21 ^{Aa}
D56	1,83 \pm 0,54 ^{Aab}	0,83 \pm 0,31 ^{Aa}
D63	2,50 \pm 0,67 ^{Aa}	0,67 \pm 0,33 ^{Aa}
D70	1,50 \pm 0,56 ^{Aab}	0,67 \pm 0,49 ^{Aa}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade.

Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na linha a 5% de probabilidade.

O turbilhonamento varia em função do vigor, concentração e da motilidade espermática (LOPES, 2013).

Conforme os autores Guan e colaboradores (2014), Selvaraju e contribuintes (2012), Tufarelli e demais autores (2011), a suplementação alimentar tende a melhorar a velocidade e motilidade espermática. Supõe-se que a oferta de suplementação influencia de forma positiva o turbilhonamento, por indiretamente melhorarem a motilidade total dos espermatozoides.

O efeito da suplementação foi significativo ($P < 0,05$) para variável vigor imediatamente após a coleta do sêmen (tempo 0), com média geral de $3,39 \pm 0,17$ para o grupo suplementado, e $2,79 \pm 0,17$ para o grupo controle. De acordo com estudos realizados por Selvaraju et al., (2012), foi observado que a ingestão de alimentos contendo alta energia afeta positivamente a velocidade e a forma com que os espermatozoides se movimentam. Em ambos os grupos, foi encontrado diferença do vigor entre o dia 56 e 0, 7 e 14 (Tabela 4).

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos para motilidade no tempo 0. No entanto houve interação significativa entre o dia de tratamento e o grupo de animais submetidos a suplementação, foi observada aumento da motilidade no tempo 0 após a coleta, nos dias 49, 56 e 63 em relação a 14 ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Apesar de neste trabalho não ter tido um padrão bem estabelecido da melhora na motilidade espermática, é proposto que uma dieta rica nutricionalmente eleva os níveis de IGF-I (DANCE et al, 2015). O aumento desse hormônio no plasma seminal tem correlação positiva com a melhora da motilidade e maturação espermática (SELVARAJUA et al., 2012; TUFARELLI et al., 2011).

Tabela 4: Média \pm erro padrão motilidade (%) e Vigor (0-5) no momento imediatamente após a coleta do sêmen e depois 180 min em banho-maria a 37°C, de touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandes/Gir, em dieta controle (n=6) e recebendo suplementação nutricional (n=6).

Dias	Vigor (0-5)		Motilidade (%)	
	0 minutos			
	Suplementação	Controle	Suplementação	Controle
0	2,67 \pm 0,33 ^{Abc}	2,00 \pm 0,37 ^{Ac}	55,00 \pm 9,92 ^{Ab}	37,50 \pm 11,24 ^{Aa}
7	2,83 \pm 0,31 ^{Aabc}	2,17 \pm 0,31 ^{Abc}	68,33 \pm 7,49 ^{Aab}	40,83 \pm 11,86 ^{Aa}
14	2,33 \pm 0,49 ^{Ac}	2,33 \pm 0,21 ^{Abc}	46,00 \pm 15,03 ^{Ab}	50,00 \pm 9,31 ^{Aa}
21	3,67 \pm 0,21 ^{Aab}	3,00 \pm 0,26 ^{Aabc}	63,33 \pm 4,41 ^{Aab}	55,83 \pm 8,60 ^{Aa}
28	3,17 \pm 0,31 ^{Aabc}	2,83 \pm 0,17 ^{Aabc}	66,67 \pm 7,60 ^{Aab}	55,00 \pm 5,63 ^{Aa}
35	3,67 \pm 0,21 ^{Aab}	2,83 \pm 0,40 ^{Aabc}	65,00 \pm 5,63 ^{Aab}	60,00 \pm 8,56 ^{Aa}
42	3,67 \pm 0,21 ^{Aab}	3,17 \pm 0,31 ^{Aabc}	75,00 \pm 7,64 ^{Aab}	57,50 \pm 7,72 ^{Aa}
49	3,83 \pm 0,17 ^{Aab}	2,83 \pm 0,31 ^{Aabc}	77,50 \pm 2,50 ^{Aa}	56,57 \pm 6,28 ^{Aa}
56	4,00 \pm 0,00 ^{Aa}	3,67 \pm 0,21 ^{Aa}	79,17 \pm 4,55 ^{Aa}	57,50 \pm 5,59 ^{Aa}
63	3,60 \pm 0,40 ^{Aabc}	3,33 \pm 0,21 ^{Aabc}	78,33 \pm 6,01 ^{Aa}	55,83 \pm 3,75 ^{Aa}
70	3,67 \pm 0,21 ^{Aab}	2,83 \pm 0,31 ^{Aabc}	72,50 \pm 6,02 ^{Aab}	50,00 \pm 6,32 ^{Aa}
180 minutos				
Dias	Suplementação	Controle	Suplementação	Controle
0	1,33 \pm 0,33 ^{Ac}	0,83 \pm 0,40 ^{Aa}	20,00 \pm 8,47 ^{Ac}	14,17 \pm 9,70 ^{Aa}
7	1,17 \pm 0,31 ^{Ac}	0,57 \pm 0,33 ^{Aa}	21,67 \pm 11,52 ^{Ac}	7,50 \pm 4,79 ^{Aa}
14	0,67 \pm 0,33 ^{Ad}	1,67 \pm 0,33 ^{Aa}	12,50 \pm 9,64 ^{Ad}	29,17 \pm 10,68 ^{Aa}
21	1,33 \pm 0,33 ^{Ac}	1,67 \pm 0,33 ^{Aa}	28,33 \pm 7,48 ^{Abcd}	25,00 \pm 8,37 ^{Aa}
28	1,67 \pm 0,21 ^{Abcd}	1,87 \pm 0,17 ^{Aa}	32,50 \pm 9,54 ^{Abcd}	35,83 \pm 6,88 ^{Aa}
35	2,50 \pm 0,43 ^{Aabc}	2,00 \pm 0,37 ^{Aa}	54,17 \pm 10,83 ^{Aabc}	38,33 \pm 10,70 ^{Aa}
42	2,67 \pm 0,33 ^{Aabc}	1,67 \pm 0,48 ^{Aa}	62,50 \pm 7,39 ^{Aabc}	27,50 \pm 10,47 ^{Aa}
49	3,00 \pm 0,45 ^{Aab}	1,67 \pm 0,33 ^{Aa}	63,33 \pm 8,91 ^{Aab}	35,83 \pm 8,51 ^{Aa}
56	3,33 \pm 0,21 ^{Aa}	2,00 \pm 0,37 ^{Aa}	72,50 \pm 4,23 ^{Aa}	30,83 \pm 8,00 ^{Aa}
63	2,17 \pm 0,40 ^{Aabcd}	2,17 \pm 0,31 ^{Aa}	55,83 \pm 7,57 ^{Aabc}	33,33 \pm 6,01 ^{Aa}
70	2,17 \pm 0,60 ^{Aabcd}	1,83 \pm 0,31 ^{Aa}	45,83 \pm 13,75 ^{Aabcd}	22,50 \pm 6,55 ^{Aa}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade.
Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade.

No presente estudo, não foi observado diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos e as variáveis de motilidade e vigor 180 minutos após a coleta. Porém, tanto o vigor quanto a motilidade diferiram ao longo do tempo no grupo que recebeu suplementação, sendo as médias do dia 56 superiores aos dias 0, 7, 14, 21 e 28 (TABELA 4).

O teste de termorresistência possui grande aceitação para bovinos por predizer a longevidade dos espermatozoides e possuir relação positiva com a fertilidade (DIMITROUPOLOS, 1967). Supõe-se que a oferta de suplementação pode influenciar na durabilidade do sêmen (SELVARAJU et al., 2012), entretanto, neste experimento, não foi possível observar um padrão claro dessa influência, ainda assim, ambos os grupos possuíram boas medias de motilidade ao final do teste de Termorrestência.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as concentrações espermáticas e espermatozoides totais, nos dois grupos. Nos animais que receberam suplementação é observado um aumento da concentração no dia 63 em relação ao dia 14 (Tabela 5).

Tabela 5: Médias \pm erro-padrão da concentração ($\times 10^6$ sptz/mL) e número total de espermatozoides ($\times 10^6$ sptz), de touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandeses/Gir, em dieta controle (n=6) e recebendo flushing nutricional (n=6).

Dias	Concentração ($\times 10^6$) sptz/mL		Total de espermatozoides ($\times 10^6$) sptz	
	Suplementação	Controle	Suplementação	Controle
0	50,8 \pm 20,4 ^{Aab}	189,2 \pm 108,6 ^{Aa}	558,3 \pm 411,9 ^{Aab}	873,2 \pm 423,4 ^{Aa}
7	86,9 \pm 44,0 ^{Aab}	37,6 \pm 26,7 ^{Aa}	971,6 \pm 494,4 ^{Aab}	235,6 \pm 178,1 ^{Aa}
14	13,5 \pm 6,7 ^{Ab}	13,5 \pm 6,0 ^{Aa}	94,1 \pm 44,5 ^{Ab}	110,5 \pm 48,4 ^{Aa}
21	173,7 \pm 56,8 ^{Aab}	114,1 \pm 35, ^{1Aa}	2083,4 \pm 769,7 ^{Aa}	945,5 \pm 324,8 ^{Aa}
28	150,0 \pm 35,0 ^{Aab}	187,9 \pm 53,0 ^{Aa}	923,3 \pm 313,5 ^{Aab}	1559,0 \pm 665,7 ^{Aa}
35	146,7 \pm 47,7 ^{Aab}	161,7 \pm 66,0 ^{Aa}	1295,6 \pm 447,4 ^{Aab}	1179,2 \pm 453,8 ^{Aa}
42	146,7 \pm 29,5 ^{Aab}	69,6 \pm 30,7 ^{Aa}	1420,6 \pm 294,9 ^{Aab}	420,0 \pm 220,1 ^{Aa}
49	139,2 \pm 36,7 ^{Aab}	67,1 \pm 26,7 ^{Aa}	1432,3 \pm 412,6 ^{Aab}	424,6 \pm 172,3 ^{Aa}
56	106,7 \pm 36,8 ^{Aab}	103,3 \pm 38,8 ^{Aa}	1113,2 \pm 473,8 ^{Aab}	830,7 \pm 409,8 ^{Aa}
63	229,6 \pm 63,4 ^{Aa}	88,8 \pm 23,3 ^{Aa}	1609,0 \pm 546,2 ^{Aab}	673,3 \pm 288,4 ^{Aa}
70	109,2 \pm 32,6 ^{Aab}	136,8 \pm 57,8 ^{Aa}	1869,6 \pm 633,1 ^{Aab}	1152,5 \pm 475,2 ^{Aa}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na linha a 5% de probabilidade

De acordo com diversos estudos, a oferta de suplementação pode potencializar a espermatocitogênese e espermiogênese, por aumentar síntese e liberação de GnRH e conseqüentemente LH, que age nas células de Sertoli (DENNISTON et al., 2003; BRINSKO, 2004; BALL; PETERS, 2006).

No entanto, a ausência de diferença entre as concentrações do grupo suplementado com o grupo controle pode ser decorrente da fase em que todos os touros encontravam-se, ou seja, na puberdade. Durante essa fase, há uma melhora gradativa das características seminais, tais como concentração espermática (FRENEAU, 1991), porém a estabilização do desenvolvimento sexual só acontece em torno de 16 a 20 semanas após o início da puberdade (RAWLINGS et al., 2008).

Ao analisar a morfologia espermática, foi obtida diferença ($P < 0,05$) nos defeitos morfológicos totais entre os grupos, em que os animais suplementados possuíam média inferior ($17,7 \pm 4,33$) aos do grupo controle ($30,4 \pm 4,28$). Não houve interação entre o efeito dia e tratamentos. No gráfico 3 é observada uma tendência de redução dos defeitos morfológicos totais.

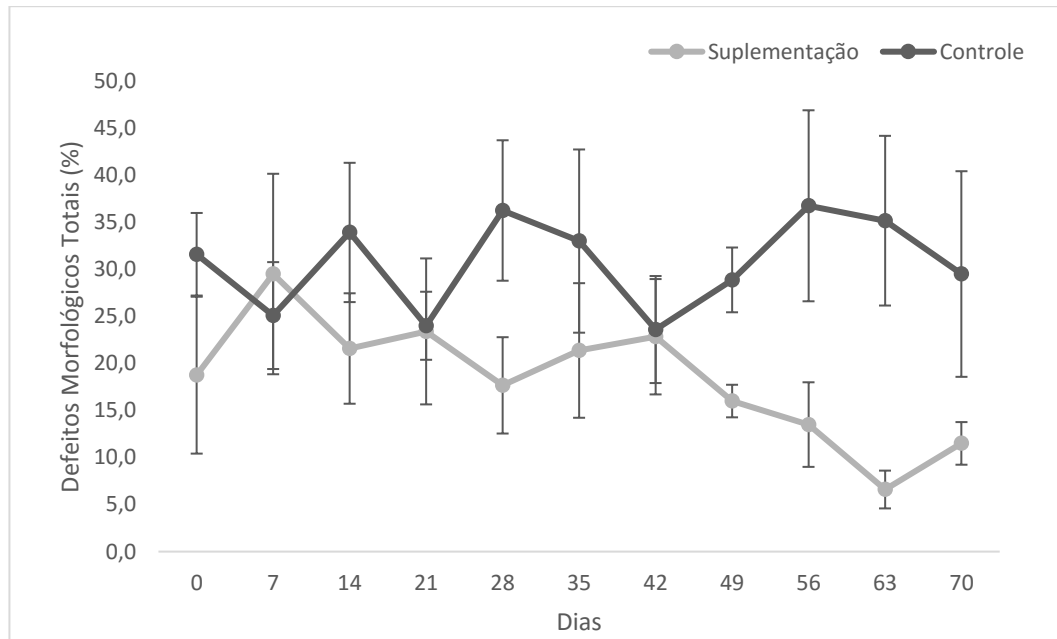


Gráfico 3: Gráfico em pontos (médias) dos defeitos morfológicos totais (%) avaliados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 de touros $\frac{3}{4}$ Holandês x Gir, púberes, recebendo suplementação proteico/energética ($n = 6$) e sem suplementação (controle, $n = 6$).

Não houve diferença entre as médias totais dos grupos que receberam suplementação e controle, nem interação entre efeito dia x tratamento para defeitos morfológicos maiores. Pode ser observado uma tendência reducional dos defeitos morfológicos para ambos os grupos ao decorrer dos dias, como demonstrado no gráfico 4.

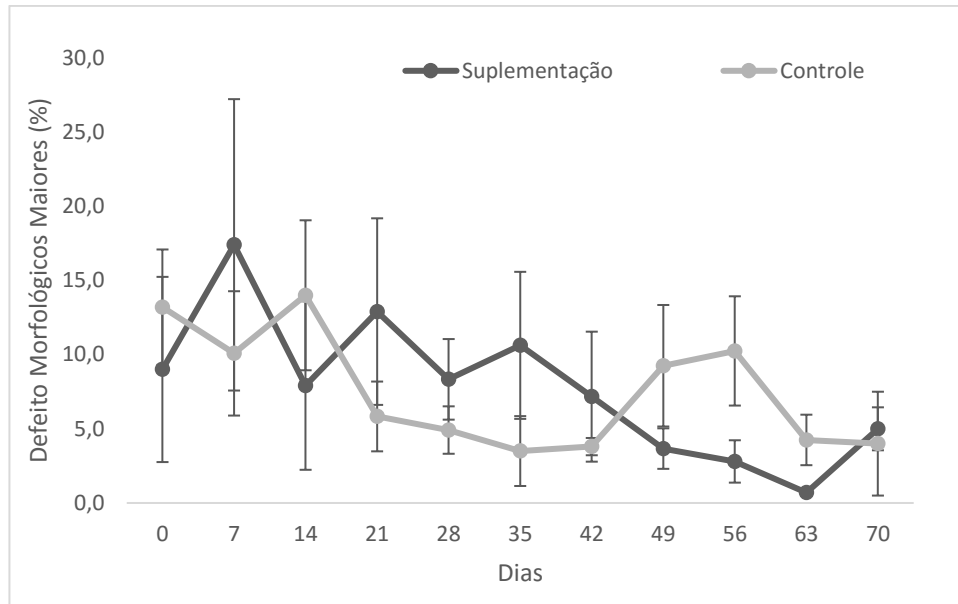


Gráfico 4: Gráfico em pontos (médias) dos defeitos morfológicos maiores (%) avaliados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 de touros $\frac{3}{4}$ Holandês x Gir, púberes, recebendo suplementação proteico/energética (n = 6) e sem suplementação (controle, n = 6)

Para os defeitos morfológicos menores, foi observada diferença entre as médias totais do grupo que recebeu suplementação ($9,98 \pm 2,70$) e o controle ($23,4 \pm 2,67$), não houve interação entre o efeito dia x tratamento. Seguindo o mesmo padrão dos defeitos morfológicos totais, verifica-se no gráfico 5 uma tendência a redução de defeitos morfológicos menores para os animais suplementados, enquanto que para os animais controle encontra-se um acentuado aumento na porcentagem de espermatozoides defeituosos.

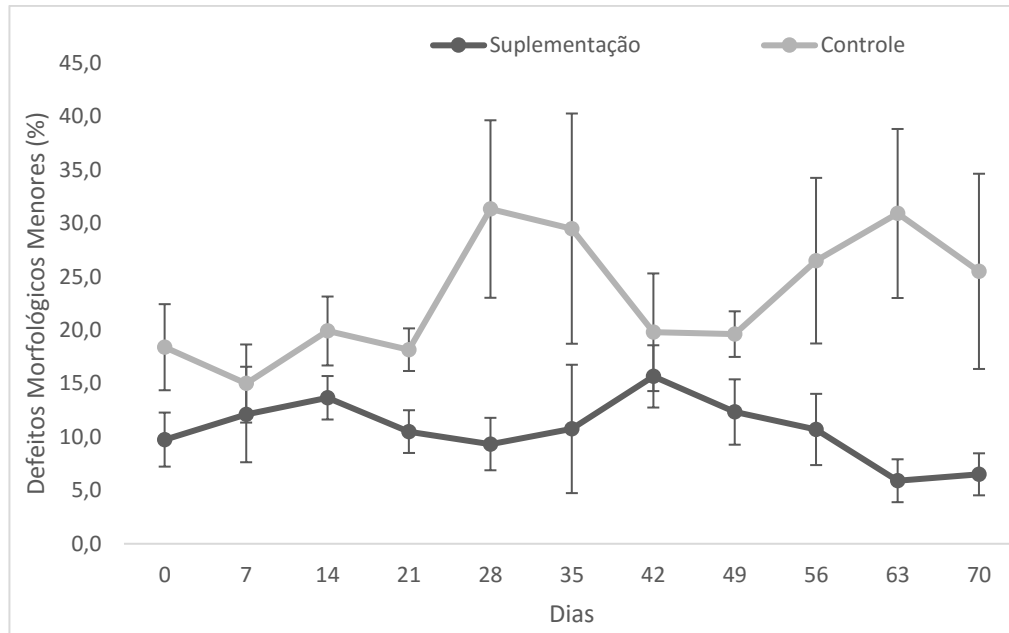


Gráfico 5: Gráfico em pontos (médias) dos defeitos morfológicos maiores (%) avaliados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 de touros $\frac{3}{4}$ Holandês x Gir, púberes, recebendo suplementação proteico/energética (n = 6) e sem suplementação (controle, n = 6).

Esses dados sugerem que a utilização de suplementação proteico/energética levou a diminuição de patologias espermáticas. Tufarelli et al., (2011) citam que uma possível explicação para diminuição da porcentagem de defeitos morfológicos é relacioná-las aos níveis de testosterona séricos, uma vez que a maior quantidade de anomalias é atribuídas a perturbações na função do epidídimo devido a níveis subnormais de testosterona (TUFARELLI et al., 2011). Porém, não é possível afirmar essa hipótese no presente estudo, uma vez que não foi realizada a mensuração da testosterona sérica total.

Sabe-se que há uma correlação genética favorável entre as características morfológicas dos espermatozoides e o perímetro escrotal de touros (SIQUEIRA, GUIMARÃES e PINHO, 2013). As correlações genéticas registradas por Dias e colaboradores (2008) entre perímetro escrotal e defeitos morfológicos totais e menores foram de -0,67 e -0,12, respectivamente, ou seja, a medida que se aumenta o perímetro escrotal, ocorre uma redução nas patologias espermáticas. Esse resultado indica associação favorável entre o desenvolvimento testicular e as características morfológicas desejáveis (SIQUEIRA, GUIMARÃES e PINHO, 2013).

Numericamente os defeitos morfológicos mais encontrados em ambos os grupos durante o período experimental foi: gota citoplasmática proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal, como mostrado na figura 8.

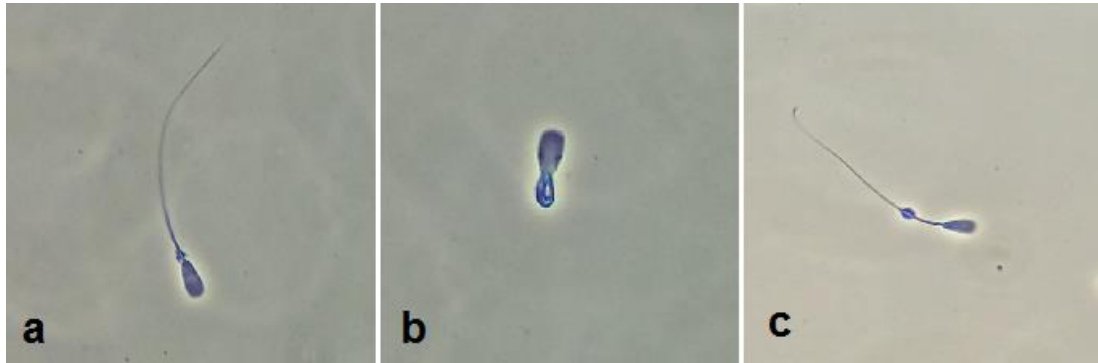


Figura 8: Espermatozoides de bovinos com patologia morfológica, em aumento de 400x. **a-** gota citoplasmática proximal, **b-** cauda fortemente dobrada ou enrolada, **c-** gota citoplasmática distal.

Fonte: Arquivo Pessoal.

A cauda fortemente dobrada ou enrolada é uma alteração que ocorre durante a maturação espermática, onde por alguma alteração, como choque osmótico por exemplo, faz o que as caudas se dobrem depois de formadas. Assim como a gota citoplasmática proximal, são defeitos morfológicos maiores, segundo a classificação de Blom (1973), e são alterações características de animais em início ou final de processo de degeneração testicular ou imaturidade sexual (ARRIOLA et al., 1985; BARTH E OKO, 1989; ARRUDA et al., 2015). Sendo assim, os achados morfológicos encontrados são condizentes com o esperado, uma vez que os animais em estudo estavam na puberdade, portanto, imaturos sexualmente.

O teste relativo à integridade funcional da membrana plasmática (hiposmótico) não apresentou diferenças nos animais suplementados e os do grupo controle. Houve diferença entre os dias 14 e 35 dentre os animais que receberam suplementação, porém, essa diferença não indica nenhum padrão de melhora ao longo do tempo (TABELA 6). Esses resultados se diferenciam dos encontrados por Souza et al., (2010) e Selvaraju e colaboradores (2012) que relacionaram a oferta de suplementação com melhora da integridade funcional da membrana plasmática.

Tabela 6: Média \pm erro-padrão do teste do Hiposmótico em função dos dias, em touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandês/Gir, em dieta controle (n=6) e recebendo suplementação (n=6).

Dias	Hiposmótico (%)	
	Suplementação	Controle
D0	47,83 \pm 9,90 ^{Aab}	39,62 \pm 10,67 ^{Aa}
D7	41,17 \pm 7,56 ^{Aab}	42,58 \pm 5,35 ^{Aa}
D14	39,33 \pm 12,06 ^{Ab}	35,25 \pm 7,59 ^{Aa}
D21	37,67 \pm 6,62 ^{Aab}	43,17 \pm 6,82 ^{Aa}
D28	40,00 \pm 6,92 ^{Aab}	42,08 \pm 6,53 ^{Aa}
D35	47,12 \pm 12,83 ^{Aa}	61,80 \pm 11,23 ^{Aa}
D42	71,33 \pm 6,57 ^{Aab}	61,00 \pm 8,44 ^{Aa}
D49	62,62 \pm 5,24 ^{Aab}	43,92 \pm 5,27 ^{Aa}
D56	67,42 \pm 5,93 ^{Aab}	42,67 \pm 7,31 ^{Aa}
D63	69,50 \pm 7,96 ^{Aab}	43,17 \pm 4,60 ^{Aa}
D70	53,92 \pm 8,54 ^{Aab}	40,25 \pm 8,77 ^{Aa}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na linha a 5% de probabilidade.

No teste da libido, não houve diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos e no decorrer dos dias (Tabela 7). Esse achado contradiz estudos realizados em carneiros suplementados para aumentarem em 10% o peso vivo em 65 dias (GUAN et al., 2014).

A oferta de suplementação promove o ganho de peso (DANCE et al., 2015; GRESSLER et al., 2015; GOTTARDI et al., 2014; GUAN et al., 2016; TUFARELLI et al., 2011) e aumento dos níveis séricos de hormônios metabólicos, tais como: leptina, insulina e IGF-1 (DANCE et al., 2015). Esses hormônios, de forma direta ou indireta, atuam potencializando e/ou estimulando a liberação de LH pela hipófise. Nos testículos, o LH age nos receptores de membrana das células de Leydig, que são estimuladas a converter colesterol em testosterona (BRINSKO, 2004). A Testosterona é o hormônio responsável por promover e manter as características sexuais associadas à masculinidade, qualidade seminal e libido (BARROS et al., 2012).

Tabela 7: Número de touros com escore de libido classificado como: Questionável (QN), Bom (BO), Muito bom (MB) e Excelente (EX) de acordo com os grupos (Suplementação e Controle) e dia de avaliação.

Grupos	Dia 0				Dia 35				Dia 70			
	QN	BO	MB	EX	QN	BO	MB	EX	QN	BO	MB	EX
SUPLEMENTAÇÃO	1	0	1	4	0	2	1	3	0	0	1	5
CONTROLE	0	2	3	1	0	1	3	2	0	0	4	2

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) pelo teste de Freeman-Halton ou teste exato de Fisher.

Em contrapartida, tais resultados corroboram com os achados por Aurélio (2008), que suplementou com nutracêutico touros nelores criados extensivamente.

É possível afirmar que, pelo fato de a maioria dos touros terem seus escores de conduta sexual classificados como “muito bom” ou “excelente” logo no primeiro dia de avaliação da libido, seja o motivo pelo qual não ter sido observada uma melhora significativa nessa avaliação. Além disso, os animais eram mestiços, cruzamento das raças Holandês e Gir, que geneticamente apresentam melhor eficiência reprodutiva, com melhor desempenho reprodutivo (RUAS et al., 2014).

Para o tempo de reação, não houve diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos e no decorrer dos dias para os bovinos que receberam a suplementação. Porém, os animais do grupo controle apresentaram diferenças com redução do tempo de D0 para D70 (tabela 8).

Tabela 8: Média \pm erro padrão do tempo de reação (minutos) no teste de eficiência em conduta sexual de touros púberes, $\frac{3}{4}$ Holandês/Gir, em dieta controle (n=6) ou recebendo suplementação (n=6).

Dias	Tempo de Reação (minutos)	
	Suplementação	Controle
D0	7,42 \pm 2,38 ^{Aa}	10,17 \pm 2,30 ^{Aa}
D35	7,50 \pm 2,46 ^{Aa}	6,58 \pm 1,82 ^{Aab}
D70	4,10 \pm 1,10 ^{Aa}	1,93 \pm 0,94 ^{Ab}

Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na coluna a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente na linha a 5% de probabilidade.

Segundo Costa e Silva (2002), a nutrição não possui efeito sobre a libido, exceto diante de uma subnutrição grave, afetando fisicamente o animal e impedindo de realizar a monta. Sendo assim, é provável que a oferta de flushing não tenha acelerado o tempo de reação dos animais.

A redução do tempo de reação observado no grupo controle entre o início (D0) e o final (D70) do experimento pode estar relacionado com a memória sexual. Ao conduzir a avaliação da libido, os touros eram manejados de forma que tivessem acesso visual do curral onde o teste era realizado, proporcionando-lhes uma previa estimulação através a conduta de outros touros frente a fêmea em estro. O estímulo visual, bem como a memória de experiências sexuais positivas, afeta de forma muito favorável o comportamento reprodutivo em touros (SENGER, 2004).

Apesar de esperado, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle e suplementados para os níveis séricos de insulina.

Em relação aos dias de tratamento, houve aumento nos níveis séricos de insulina do último dia de tratamento em relação ao primeiro para os dois grupos experimentais (Gráfico 6).

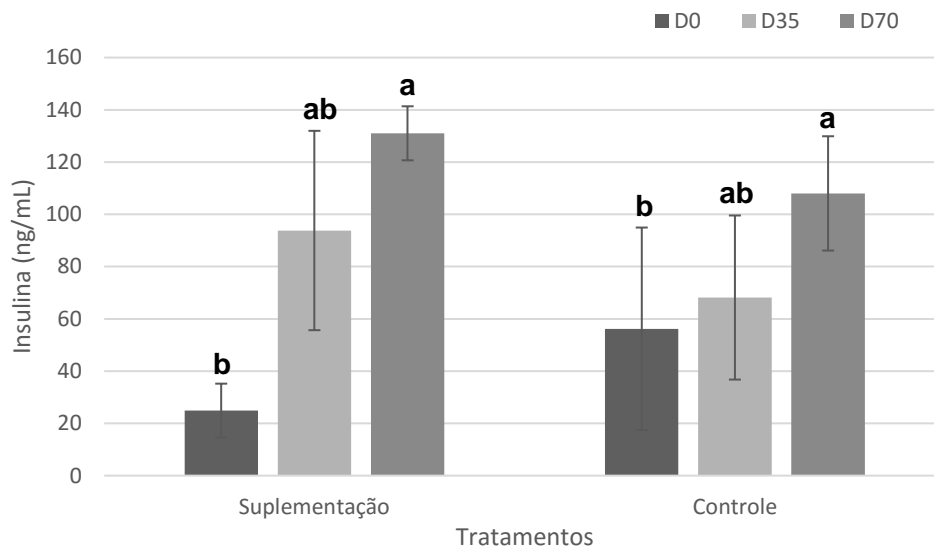


Gráfico 6: Gráfico em barras demonstrando as diferenças ($P \leq 0,05$) das médias \pm erro padrão dos níveis séricos de insulina (ng/mL) entre os dias (D0, D35 e D70) nos grupos com e sem administração de flushing.
a, b Diferença significativa entre os dias de tratamento

A maior ingestão de alimentos, aumenta a secreção de insulina (ZHANG et al., 2005b), essa substância possui receptores presentes no hipotálamo (BLACHE et al., 2002), e sinaliza o estado nutricional do animal para o hipotálamo via neuropeptídeos Y (DANCE et al., 2015). Sendo assim, será responsável por desempenhar um papel importante na reprodução, atuando na regulação da síntese de GnRH e, conseqüentemente, controlar a secreção das gonadotrofinas.

O não aparecimento de diferença em relação à insulina entre os tratamentos e aumento substancial dos níveis séricos de insulina com o passar dos dias para os dois grupos pode, mais uma vez, estar relacionado à fase de puberdade dos animais. Nesse período, os animais estão passando por alterações nos padrões de produção e liberação dos hormônios gonadotróficos e andrógenos (BALL, PETERS, 2006). Como a insulina é um dos principais hormônios metabólicos relacionado à reprodução

(BLACHE et al., 2002), pode ser que tenha sofrido influência dessas alterações hormonais presentes na puberdade.

5 CONCLUSÃO

A oferta de suplementação não interferiu no comportamento sexual dos animais. O tratamento teve interferência positiva em algumas características importantes na qualidade seminal, como defeitos morfológicos. As variáveis circunferência escrotal, peso e ganho médio diário são altamente relacionadas à precocidade e ganho reprodutivo, e foram positivamente influenciadas pelo tratamento.

6 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula** - 5ª Ed. ArtMed. 2008.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v.57, S2, p.380-403, 1983.
- ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., GARCIA, A.R., SANTOS, G.D.C., LEITE, T.G., LETÍCIA ZOCCOLARO OLIVEIRA, L.Z., LANÇONI, R., RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.47-60, 2015.
- AURÉLIO, P.T.F. Avaliação Andrológica, libido e hormônios em touros Nelores (*Bos taurus indicus*), suplementados com nutracêuticos. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, p.1-76. Presidente Prudente - SP, 2008.
- ASBIA – Associação Brasileira de inseminação artificial. Relatório de comercialização de sêmen de 2011. <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/> acessado dia 02 de julho de 2017.
- BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em Bovinos**. 3ed. Editora Roca. 2006.
- BARASH, I. A., CHEUNG, C. C., WEIGLE, D. S., REN, H. O. N. G. P. I. N. G., KABIGTING, E. B., KUIJPER, J. L., STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3144–3147, 1996.
- BARBOSA, R.T.; MACHADO, R.; BERGASMACHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. **Circular Técnica EMBRAPA**, n. 41, p. 1-13, 2005.
- BARTKE, A., CHANDRASHEKAR, V., TURYN, D., STEGER, R. W., DEBELJUK, L., WINTERS, T. A., KOPCHICK, J. J. Effects of Growth Hormone Overexpression and Growth Hormone Resistance on Neuroendocrine and Reproductive Functions in Transgenic and Knock-Out Mice 2 (44434). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, n.2, p.113-123, 1999.
- BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISITIN, J.A. Estudo comparativo entre as provas rápidas e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3-4, p.7-11, 1981.
- BARROS, C.M.; DISTALIS, L.C. **Farmacologia Veterinária**. São Paulo. Manole, 2012.
- BARTH, A.D. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 8, p. 656, 1989.
- BARTH, A. D.; BRITO, L. F.; KASTELIC, J. P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 485-494, 2008.
- BARTH, A.D., OKO R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. **LowaState University Press, Ames**, p. 130–192, 1989.
- BEEF IMPROVEMENT FEDERATION - BIF. Guidelines for the bull breeding soundness evaluation. **Athens**, Georgia. p.151154, 2002.

- BENITES, N. R.; BARUSELLI, P. S. Medicamentos empregados para sincronização do crescimento folicular e da ovulação para transferência de embriões. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Eds.). . **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. Ed, p. 343 – 361, 2006.
- BLACHE, D.; ADAM, C. L.; MARTIN, G. B. **The mature male sheep: a model to study the effects of nutrition on the reproductive axis** Large mammals as neuroendocrine models: 59pp. 219-233, 2002.
- BLOCKEY, M.A.B. Serving capacity a measure of the serving efficiency of bulls during pasture mating. **Theriogenology**, v. 6, p. 393-401, 1976.
- BLOCKEY, M.A.B. Observations on group mating of bulls at pastures. **Applied Animal Ethology**, v.5, p.15-34, 1979.
- BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fertil Steril**, v.1, p.223-238, 1950.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: Symposium Internationale de Zootechnie, 7, 1972, Milano, Italy. **Proceedings...** Milano: SIZ, 1972.
- BLOM, E.; The ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinary medicine**, v.25, p.383-391, 1973.
- BOMFIM, M.A.D., ALBUQUERQUE, F.H.M.A.R., SOUSA, R.T. Papel da nutrição sobre a reprodução ovina. In: Acta Veterinaria Brasilica, **Anais do VII CONERA**, v.8, Supl. 2, p. 372-379, 2014.
- BOPAPE, M. A., LEHLOENYA, K. C., CHOKOE, T. C., NEDAMBALE, T. L. Comparison of Electro Ejaculator and Artificial Vagina on Semen Collection from South African Indigenous Goat Following Assessment by Computer Aided Sperm Analysis. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 5, n. 02, p. 210, 2015.
- BRINSKO, S. P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J. G. (Ed.). . **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. p. 432–439.
- BRITO, L. F., SILVA, A. E., UNANIAN, M. M., DODE, M. A., BARBOSA, R. T., & KASTELIC, J. P. Sexual development in early- and late-maturing Bos indicus and Bos indicus × Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 62, p. 1198–1217, 2004.
- BRUNING, J.C., GAUTAM, D., BURKS, D.J., GILLETTE, J., SCHUBERT, M., ORBAN, P.C. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, v. 289, p. 2122-2125, 2000.
- CARDOSO, F. M. Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebu (Bos indicus) da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 1977.
- CARRER FILHO, L., JÚNIOR, C. K., JÚNIOR, F. A. B., MENEGASSI, S. R. O., PEREIRA, G. R., DOS SANTOS, M. D., LOPES, F. G. Avaliação andrológica por

pontos e teste da libido em curral de touros jovens da raça Braford. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 9, n. 2, p. 233-243, 2015

CATES, W. F. Observations on scrotal circumference and its relationship to classification of bulls. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Theriogenologists**,. Cheyenne, WY: p. 1–19, 1975.

CATUNDA, A.G.V., LIMA, F.R.G., LIMA, I.C.S., MACHADO, A.A.C., GADELHA, C.R.F., PEREIRA, E.S., MARTINS, G.A., CAMPOS, A.C.N. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.1, p.3-9, 2014.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, 2013.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 41–50, 1 jul. 2002.

CHACUR, M. G., TIAGO FERREIRA AURÉLIO, P., OBA, E., BRAGA LAPOSY, C., SCALON JÚNIOR, O., INAGUE, L., DO NASCIMENTO KRONKA, S. Influência de um nutracêutico no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos taurus indicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 439-450, 2010.

CHASE, C. C., CHENOWETH, P. J., LARSEN, R. E., OLSON, T. A., HAMMOND, A. C., MENCHACA, M. A., & RANDEL, R. D. Growth and reproductive development from weaning through 20 months of age among breeds of bulls in subtropical Florida. **Theriogenology**, v. 47, n. 3, p. 723–745, fev. 1997.

CHENOWETH, Peter J. Bull libido/serving capacity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 331-344, 1997.

CHENOWETH, P.J. Examination of bulls for libido and breeding ability. **The Veterinary clinics of North America. Large animal practice**, v.5, n.1, p.59-74, 1983

CHENOWETH, P. J.; KASTELIC, J. P. Clinical Reproductive Physiology and Endocrinology of Bulls. In: **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p. 221–228, 2007.

CHENOWETH, P.J. Reproductive selection of males: current and future perspectives. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 133-138, 2011.

CHENOWETH, P.J. Libido and mating ability in bulis. In: MARROW, D.A. Current therapy in **Theriogenology**, Phyladelphia, W.B. Saunders. v.4, p.342. 1980.

CHILLIARD Y, BONNET M, DELAUAUD C, FAULCONNIER Y, LEROUX C. DJIANE J, BOUQUIER F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.271-295, 2001.

CORRÊA, A. B., VALE FILHO, V. R., CORRÊA, G. S. S., ANDRADE, V. J., SILVA, M. A., & DIAS, J. C. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. **Arquivo brasileiro medicina veterinária e zootecnia**, v.58, n. 5, p. 823-830, 2006.

COSTA-E-SILVA, E. V. Comportamento sexual de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) em monta a campo e em testes de libido. 2002. 137 p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

COULTER G.H.; KOZUB G.C. Efficacy of methods used to test fertility of beef bulls used for multiple-sire breeding under range conditions. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 7, p. 1757-1766, 1989.

CRUDELI, G. A.; FONSECA, V. O. Prova de capacidade de serviço em touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). In: Congresso brasileiro de reprodução animal, 8, 1989, Belo Horizonte. Suplemento, **Resumo**, Belo Horizonte, p.112-113, 1989.

CRUZ, D.F., FREITAS, M.J., Patrício, A., Fardilha, M. Vias de sinalização reguladoras das funções do espermatozoide. **Revista Internacional de Andrologia**, v. 12, n. 3, p. 104 – 111, 2014.

CUNHA, M. S., BONATO, D. V., TAIRA, A. R., TEIXEIRA, P. P. M. Degeneração testicular em machos: dos animais ao homem. **Revista Investigação**, v. 14, n. 6, p. 54-61, 2015.

CUNHA, E. D., SILVA, C. D., MARTINS, C. F. Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado. In *Embrapa Cerrados-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. A produção animal no mundo em transformação: **Anais**. Brasília, DF: SBZ, 2012. 1 CD-ROM.

DANCE, A., THUNDATHIL, J., WILDE, R., BLONDIN, P., KASTELIC, J. Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 987–998, 2015.

DETMANN, E., PAULINO, M. F., ZERVOUDAKIS, J. T., CECON, P. R., VALADARES FILHO, S. D. C., GONÇALVES, L. C., MELO, A. J. N. Níveis de proteína bruta em suplementos múltiplos para terminação de novilhos mestiços em pastejo durante a época seca: desempenho produtivo e características de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.1, p. 169-180, 2004.

DENNISTON, D. J.; THOMAS, M.G.; KANE, K. K.; ROYBAL, C. N.; CANALES, L; HALLFORD, D. M.; REMMENA, M. D.; HAWKINS, D. E. Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal on ovariectomized state. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.25-31, 2003.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Editorial ACRIBIA, Zaragoza-Espanha, 1980.

DIAS, J.C., ANDRADE, V.J., MARTINS, J.A.M., EMERICK, L.L., VALE FILHO, V.R. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.53-59, 2008.

DIAS, J. C.; ANDRADE, V.J.; EMERICK, L.L.; MARTINS, J.A.M.; FILHO, V.R.V. Níveis periféricos de testosterona total em touros Guzerá. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 64-73, 2014.

DIMITROPOULOS, E. Données actuelles sur les milieux de dilution du sperm de taureau at criteres d'appréciation de su valeur fécondan te avant et après la congelation. **Seminaire de San Miniato**, 1972.

EMBRAPA GADO DE CORTE. Apostila: Capacidade reprodutiva de touros de corte. 2008. Disponível em: Acesso em: 12 mar. 2017.

FAYRER-HOSKEN, R. Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. **Veterinary Clinics of No America: Food Animal Practice**, v.13, n.2, p. 195-202. 1997.

FILHO, L. C. Determinação da puberdade e da maturidade sexual de touros jovens da raça braford criados a pasto. In: 42º Congresso Brasileira de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA –Curitiba, **Anais**, 31/10 a 02/11 de 2015.

FILHO, W. C. M. Espermatogênese em bovino. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu, 2006.

FONSECA, V.O.; SANTOS, N.R; MALINSKI, P.R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfofísicas do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.36-39, 1997.

FONTES, C.A.A. Composição corporal, exigências líquidas de nutrientes para ganho de peso e desempenho produtivo de animais zebuínos e mestiços europeu-zebu. Resultados experimentais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES, 1., 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.419-455, 1995.

FORDYCE G, FITZPATRICK LA, COOPER NJ, DOOGAN VJ, DE FAVERI J, HOLROYD RG. Bull selection and use in northern Australia, 5. Social behaviour and management. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.81-99, 2002.

FRANDSON, R.D. LEE, W, W.; DEE FAILS, A. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 2005.

FRANDSON, R.D; WILKE, W.L; e FAILS, A.D. **Physiology of Male Reproduction**. In Anatomy and Physiology of Farm Animals (Wiley-Blackwell), 7ª ed. pag.413-419, 2009.

FREITAS, V.J.F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo, Roca, p.57-82, 2008.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 160-170, 2011.

FRENEAU, G. E. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Holandeses-PB e mestiços F1 Holandês x Gir desde os seis até os 21 meses de idade (Puberdade e pós- puberdade). [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 1991.

- GALLOWAY, D. B. Fatores que afetam a fertilidade bovina. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 209-56, 1979.
- GALLOWAY, D.B. Introductory review; factors affecting fertility. In: **BULLS. Course held at the University of Queensland Veterinary School**, v.18, n.22, p.2-23, 1974.
- GARNER DL, HAFEZ ESE. Espermatozóide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7º ed. Barueri: Manole Ltda, Cap.7, p. 97-110, 2004.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª. edição. São Paulo: Roca, 2008.
- GONZALEZ, F. H., CERONI da SILVA, S. Bioquímica hormonal. In: **Introdução à bioquímica hormonal**. 2.ed. Porto Alegre (RS): Editora da UFRGS. 2006. Cap.7, p. 251-312.
- GOTTARDI, F. P., SOUZA JÚNIOR, A., BARBOSA, Y., MARQUES, C., BEZERRA, L. R., ARAÚJO, M. J., TORREÃO, J. Efeito do flushing sobre o desempenho reprodutivo de ovelhas Morada Nova e santa inês submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 329–338, 2014.
- GRESSLER, M. A. L., SOUZA, M. I. L., SOUZA, A. S. D., FILIÚ, W. F. D. O., AGUENA, S. M., FRANCO, G. L. Biochemical profiles of ewes submitted to short-term nutritional supplementation in subtropical region. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.16(1), p. 210-222, 2015.
- GUAN, Y., MALECKI, I. A., HAWKEN, P. A., LINDEN, M. D., & MARTIN, G. B. Under-nutrition reduces spermatogenic efficiency and sperm velocity, and increases sperm DNA damage in sexually mature male sheep. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 3–4, p. 163–72, out. 2014.
- GUAN, Y., LIANG, G., HAWKEN, P. A., MEACHEM, S. J., MALECKI, I. A., HAM, S., MARTIN, G. B. Nutrition affects Sertoli cell function but not Sertoli cell numbers in sexually mature male sheep. **Reproduction, fertility, and development**, 17 dez. 2016.
- GUIMARÃES, J. D. **Maximização do uso de touros a campo**. I Simpósio de produção de gado de corte. **Anais...Viçosa: SIMCORTE**, 1999
- GUIMARÃES, J. D., FACIONI, S. E., SIQUEIRA, J. B., OLIVEIRA, R. P., PEREIRA, J. E., STERMANN, J. B., CORRÊA, J. B. Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 379–388, 2011.
- H, L. J. Nutritional influences on testicular composition and function in mammals. In: HAMILTON, D.; GREEP, R. (Eds.). **Handbook of physiology**. Washington, USA: American Physiological Society, 1975. p. 225–232.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HAFS, H. D.; LOUIS, T. M.; STELLFLUG, J. N. Increased sperm numbers in the deferent duct after prostaglandin F_{2α} in rabbits. **Experimental Biology and Medicine**, v. 145, n. 3, p. 1120-1124, 1974.
- HARSTINE, B. R., MAQUIVAR, M., HELSER, L. A., UTT, M. D., PREMANANDAN, C.,

DEJARNETTE, J. M., DAY, M. L. Effects of dietary energy on sexual maturation and sperm production in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 6, p. 2759, 2015.

HENRY, B. A., GODING, J. W., TILBROOK, A. J., DUNSHEA, F. R., & CLARKE, I. J. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. **The Journal of endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 67–77, jan. 2001.

HENRY, M.; NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de imprensa. <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3268&busca=1&t=ppm-rebanho-bovino-alcanca-marca-recorde-215-2-milhoes-cabecas-producao-leite> acessado dia 02 de junho de 2017.

JEYENDRAN, R. S., VAN DER VEN, H. H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B. G., & ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of reproduction and fertility**, v.70, n.1, p. 219-228, 1984.

JIMÉNEZ-SEVERIANO, H. Sexual development of dairy bulls in the Mexican tropics. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 921–32, set. 2002.

JOHNSTON, V. S., HAGEL, R., FRANKLIN, M., FINK, B. & GRAMMER, K. Male facial attractiveness: evidence for a hormone-mediated adaptive design. **Evolution and Human Behavior**. V.22, p.251–267, 2001.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Sistema Genital. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D. (Eds.). **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2007. p. 1169–1244; 1415.

KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 18-23, 2014.

KEALEY, C. G., MACNEIL, M. D., TESS, M. W., GEARY, T. W., BELLOWS, R. A. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 2, p. 283, 2006.

KEMPINAS, W. D. G., & KLINEFELTER, G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v.4, n.2, p 1–12, 2014.

KNOLBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of reproduction**, New York: Raven Press, p.1174-1290, 1993.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H-G. **Anatomia dos animais domésticos**: texto e atlas colorido. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

KUDRYAVTSEV, I.V.; SAFRONOVA, L.D.; KUDRYAVTSEV, P. I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, n. 6, p. 337-346, 2003.

LEATHAM, J.H. Nutritional influences on testicular composition and function in mammals. **Endocrinology**, v.5, p.225–232, 1975.

LIMA, F. P. C. **Puberdade em tourinhos da raça Nelore avaliada pelo perímetro escrotal, características seminais e endócrinas**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2009.

LOPES, F. G., JUNIOR, C. K., JÚNIOR, F. A. B., OKANO, W., DA SILVA, L. C., DA SILVA JÚNIOR, M. A. G. Maturidade sexual e classificação andrológica por pontos (cap) em touros jovens da raça nelore puros de origem (po). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.1, p.168-173, 2013.

LUCY, M.C. Glicose sanguínea em ruminantes: Um metabólito crítico para a reprodução de vacas em lactação. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 15., 2011, Uberlândia-MG, **Anais...** Uberlândia 2011, CD-ROM.

LUNSTRA, D.-D.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in Beef Bulls: Acrosome Morphology and Semen Quality in Bulls of Different Breeds. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 638, 1982.

MAGGIONI, D., ROTTA, P. P., ITO, R. H., MARQUES, J., ZAWADZKI, F., PRADO, R., PRADO, I. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n.11, 2008.

MARTIN, G. B., BLACHE, D., MILLER, D. W., & VERCOE, P. E. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. **Animal**, v. 4(7), p. 1214–1226, 2010.

MANI, M. R., SIVAKUMAR, R., RAVISANKAR, B., VALLI, G., RAVICHANDRAN, K., ARUNAKARAN, J., ARULDHAS, M. M. Growth hormone directly stimulates testosterone and oestradiol secretion by rat Leydig cells in vitro and modulates the effects of LH and T3. **Endocrine journal**, v.47, n. 2, p.111-118, 2000.

MANN, T; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. **Springer Science & Business Media**, 2012.

MAYNARD, L. A. **Nutrição Animal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Freitas Bastos, 1984.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

MENDOZA, G.; WHITE, I. G.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, v.32, n.3, p.455-466, 1989.

MIES FILHO, A. Coleta de sêmen nas diferentes espécies. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5ª ed., Porto Alegre: Sulina, p.385-432, 2 v., 789 p, 1982.

MIES, F. **A Inseminação Artificial**. 6.ed. Sulina: Porto Alegre, p.489, 1987.

MILLER, D.W.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B. Insulin stimulates LH secretion in rams when infused into the third cerebral ventricle: comparison with the effect of improved nutrition. **Journal of Endocrinology**. Vol.147,p.321–329, 1995.

MILLER, D.W.; HARRISON, J.L.; BENNETT, E.J.; FINDLAY, P.A.; ADAM, C.L. Nutritional influences on reproductive neuroendocrine output: insulin, leptin and orexigenic neuropeptide signaling in the ovine hypothalamus. **Endocrinology**, Vol.148, p. 5313–5322, 2007.

MORAES, G. P. Puberdade e maturidade sexual de tourinhos Senepol, criados semi-extensivamente na região do Triângulo Mineiro. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2012.

N'DIAYE, M. R., SUN, S. S., FANUA, S. P., LOSETH, K. J., SHAW WILGIS, E. F., CRABO, B. G. Growth hormone receptors in the porcine testis during prepuberty. **Reproduction in domestic animals**, v.37, n. 5, p.305-309, 2002.

NEIVA, R.S. **Produção de Bovinos Leiteiros- Planejamento, Criação, Manejo**, Editora Gradual, 2 ed., 2000.

O'DONNELL, L., ROBERTSON, K.M., JONES, M.E., SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v.22, n.3, p289-318, 2001.

OLIVEIRA, C.B., GUIMARÃES, J.D., COSTA, E.P., SIQUEIRA, G.B., TORRES, C.A.A., CARVALHO, G.R., GUIMARÃES, S.E.F. Avaliação do comportamento sexual em touros Nelore: comparação entre os testes da libido em curral e do comportamento sexual a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.32-42, 2007.

OONK, H. B., TURKSTRA, J. A., SCHAAPER, W. M. M., ERKENS, J. H. F., SCHUITMAKER-DE WEERD, M. H., VAN NES, A., & MELOEN, R. H. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH. **Vaccine**, v. 16(11-12), p. 1074-1082, 1998.

OSBORNE, H.G.; WILLEANS, L.G.; GALLOWAY, D.B. A test for libido and serving ability in beef bulls. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n.10, p. 467-77, 1971.

PARENT, A. S.; BOURGUIGNON, J. P. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. **Journal of neuroendocrinology**, v. 12, n. 5, p. 383–5, maio 2000.

PAULINO, M. F., FIGUEIREDO, D. D., MORAES, E. H. B. K., PORTO, M. O., SALES, M. F. S., ACEDO, T. S., VALADARES FILHO, S. D. C. Suplementação de bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. In: **Anais: Simpósio de produção de gado de corte**, v. 4, p. 93-144, 2004.

PEÑA ALFARO, C.E. Importância da avaliação andrológica na seleção de reprodutores a campo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.152-153, 2011.

PETHERICK, J.C. A Review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle and individual bull and herd fertility. **Applied Animal Behaviour Science**, v.90, n.3, p.185-205, 2005.

PINEDA, N. R.; FONSECA, V. O.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo preliminar da influência do perímetro escrotal sobre a libido em touros jovens da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 69-75, 2006.

PINEDA, N. R.; FONSECA, V. O.; PROENCA, R. V. Reproductive potential of Nelore bulls: libido, serving capacity and efficiency in mating with a large number of cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 1, p. 44–50, 2000.

PINEDA, N. R.; LEMOS, P. F.; FONSECA, V. O. Comparação entre dois testes de avaliação do comportamento sexual (libido) de touros Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.21, n.4, p.29-34, 1997.

PIRES, A. V. Aspectos nutricionais relacionados à reprodução, p. 537-559. In: Berchielli T.T., Pires A.V. & Oliveira S.G. (ed.) **Nutrição de ruminantes**. Editora FUNEP, Jaboticabal, 2011.

PRADA, F. Influência da nutrição animal na reprodução de touros: revisão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2005.

PRUITT, R. J., CORAH, L. R., STEVENSON, J. S., KIRACOFÉ, G. H. Effect of energy intake after weaning on the sexual development of beef bulls. II. Age at first mating, age at puberty, testosterone and scrotal circumference. **Journal of animal science**, v. 63, n. 2, p. 579–85, ago. 1986.

RAWLINGS, N., EVANS, A. C. O., CHANDOLIA, R. K., BAGU, E. T. Sexual maturation in the bull. **Reproduction Domestic Animals**, V.43, SUPPL.2, P. 295-301, 2008.

REICHENBACH, H., MORAES, J., NEVES, J. P., GONÇALVES, P., FIGUEIREDO, J., FREITAS, V. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. **GONÇALVES, PBD; FIGUEIREDO, JR; FREITAS, VJF Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, v. 2, p. 57-82, 2008.

REIS, J. D. A. D. Influência do clima nas características do sêmen e na composição proteica do plasma seminal em zebus e taurinos. **Dissertação** (Mestrado em Ciências animal), Universidade do Oeste Paulista. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (Unoeste), 2013.

REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; VIEIRA, B. R.; MORETTI, M. H. Manejo Alimentar na terminação em pasto. In: **SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS: Manejo Alimentar de Bovinos, 9ed., 2011, Piracicaba. Anais**, Piracicaba: FEALQ, p. 341–382, 2011.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p. 77-86, 1994.

ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 397, n. 1, p. 4-14, 2014.

ROBINSON, J. J., ASHWORTH, C. J., ROOKE, J. A., MITCHELL, L. M., & MCEVOY, T. G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v.126(3), p. 259-276, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.312-318, 2003.

RUAS, J. R. M., DA SILVA, E. A., QUEIROZ, D. S., JÚNIOR, J. A. G. S., PEREIRA, M. E. G., DE CASTRO MENEZES, G. C., DA COSTA, M. D. Vacas F1 Holandês x Zebu: uma opção para sistema de produção de leite em condições tropicais. **Informação Agropecuária**, v.35, n.4, p.113-120, 2014.

RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Ed.). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Bolesta: Cache River Press, p. 1-40, 1990.

SAACKE, R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, v.70, p.473-478, 2008.

SALLES, P. A. **Critérios de seleção para características de crescimento em machos da raça nelore**. [s.l.] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), 1995.

SANTOS, K. J. G.; MELO, C. S.; PALES, A. P. Seleção de touros através da puberdade, maturidade e fatores envolvidos na fertilidade. **Revista Eletrônica da Faculdade de Montes Belos**, v. 1, n. 1, p. 72-87, 2005.

SANTOS, N. R. Comportamento sexual de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) a pasto. Belo Horizonte. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 70p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), 2001.

SCHEID, I.R. **Manual de inseminação artificial em suínos**: procedimentos e métodos de laboratório. Concórdia: CNPSA/ EMBRAPA, p. 48, 1993.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of animal science**, v. 70, n. 4, p. 1271–82, abr. 1992.

SELVARAJU, S., REDDY, I. J., NANDI, S., RAO, S. B. N., RAVINDRA, J. P. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal reproduction science**, v. 113, n. 1–4, p. 60–70, jul. 2009.

SELVARAJU, S., SIVASUBRAMANI, T., RAGHAVENDRA, B. S., RAJU, P., RAO, S. B. N., DINESHKUMAR, D., & RAVINDRA, J. P. Effect of dietary energy on seminal plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I), serum IGF-I and testosterone levels , semen quality and fertility in adult rams. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 646–655, 2012.

SENGER, P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions**, 2ª ed, p. 44-143; p. 214-283, 2004.

SETCHELL, B.; WAITES, G.M.H.; LINDNER, H.R. Effect of undernutrition on testicular blood flow and metabolism and the output of testosterone in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility** 9, p. 149–162, 1965.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; PINHO, R. O. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte : uma revisão. **Rev**

Bras Reprod Anim. Supl. Belo Horizonte, v. 37, n. 1, p. 3–13, 2013.

SILVA, A.E.D.F. et al. Efeito da estacionalidade nas características testiculares esperáticas de touros Nelore e mestiços. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., Belo Horizonte, 1987. Resumos... Belo Horizonte, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 55, 1987.

SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.; PORTO, J.A. et al. Estacionalidade na atividade sexual de machos Nelore e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore: características biométricas testiculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.10, p.1745-1750, 1991.

SILVA, A. E. D. F. VII - Seleção de touros: puberdade, maturidade e fatores envolvidos na fertilidade. In. MARGOR, A. N. **Curso de andrologia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 98-127, 2002.

SOEDE, N. M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycle in pigs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, p. 251-258, 2011.

SOUZA, F. A., MARTINS, J.A.M., OSORIO, J.P., VALE FILHO, V.R., ANDRADE, V.J., D'OLIVEIRA-SOUSA, A., PATRÍCIO, F.A.C, JARAMILLO, L.C., IGF-I, leptina, insulina e proteínas associadas à qualidade do plasma seminal: ação local, **Revista de Medicina Veterinária** Nº 20 / julho-dezembro 2010.

SPICER, L. J., ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic animal endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 223-245, 1995.

STABENFELDT, G. H.; DAVIDSON, A. P.; BRINSKO, S. P. Reprodução e Lactação. In: CUNNINGHAM, J. G. (Ed.). **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 385–431.

STRÖM, B; ROTA, A; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**. v.48,n.2, p.247-256, 1997.

SUSIN, S. A., ZAMZAMI, N., CASTEDO, M., HIRSCH, T., MARCHETTI, P., MACHO, A., KROEMER, G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 4, p. 1331–41, 1 out. 1996.

TAVARES, L. C. Análise de polimorfismo no gene da leptina em bovinos da raça Braford. **Monografia – Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 1 – 31, 2014.

TROCÓNIZ, J. F., BELTRÁN, J., BASTIDAS, H., LARREAL, H., & BASTIDAS, P. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing guzerat and Nelore bulls. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 815–26, abr. 1991.

TUFARELLI, V., LACALANDRA, G. M., AIUDI, G., BINETTI, F., & LAUDADIO, V. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 2, p. 339–45, fev. 2011.

VALE FILHO, V. R. **Andrologia no touro: Avaliação genital, exame de sêmen e classificação por pontos**. I FORUM NACIONAL DE EQUINOCULTURA. Anais...Belo Horizonte: CBRA, 1997.

- VAN CAMP, S. D. Common causes of infertility in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n. 2, p. 203-230. 1997.
- VASCONCELOS, J.L.M.; LEIVA, T. ; PERES, R.F.G . Diferentes mecanismos pelos quais a nutrição interfere na eficiência reprodutiva de vacas de leite e de corte. In: **VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL. Do CBNA**, 26/09/2014. 2014.
- VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H. et al. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3827-3835, 1991.
- VIU, M. A. O., MAGNABOSCO, C. U., FERRAZ, H. T., GAMBARINI, M. L., OLIVEIRA FILHO, B. D., LOPES, D. T., & VIU, A. M. F. Desenvolvimento ponderal , biometria testicular e qualidade seminal de touros nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 53–57, 2006.
- WALKER, J.; PERRY, G.; DALY, R.; OLSON, K. Bull management and nutrition. Departments of Animal and Range Sciences and Veterinary Science South Dakota State University, 2009.
- WILDEUS, S.; HOLROYD, R. G.; ENTWISTLE, K. W. Patterns of puberal development in Sahiwal and Brahman cross bulls in tropical Australia. I. Growth and semen characteristics. **Theriogenology**, v. 22, n. 4, p. 361–73, out. 1984.
- WILLIAMS, G. L., AMSTALDEN, M., GARCIA, M. R., STANKO, R. L., NIZIELSKI, S. E., MORRISON, C. D., & KEISLER, D. H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic animal endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 339–49, jul. 2002.
- WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Prepuberal Behavior and Puberal Characteristics of Beef Bulls on High Nutrient Allowance. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 761, 1965.
- ZACHMAN, M. Interrelations between growth hormone and sex hormones – physiology and therapeutic consequences. **Hormone Research in Paediatrics**, (Suppl. 1), v.38, p.1-8, 1992.
- ZEMJANIS, R. **Diagnostic and therapeutic techniques in animal reproduction**. 2.ed. Baltimore, Williams Wilkins Co., 242p, 1970.
- ZHANG, S., BLACHE, D., BLACKBERRY, M. A., & MARTIN, G. B. Dynamics of the responses in secretion of luteinising hormone, leptin and insulin following an acute increase in nutrition in mature male sheep. **Reproduction, fertility, and development**, v. 16, n. 8, p. 823–9, 2005a.
- ZHANG, S., BLACHE, D., BLACKBERRY, M. A., & MARTIN, G. B. Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition in mature male sheep. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 3–4, p. 257–69, set. 2005b.
- ZIEBA, D. A., AMSTALDEN, M., MACIEL, M. N., KEISLER, D. H., RAVER, N., GERTLER, A., WILLIAMS, G. L. Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 228, n. 3, p. 325–30, mar. 2003.

ANEXO A: Ficha de Avaliação de Exame Andrológico

Nome do animal:		Nº de identificação:			
Data de nascimento:		Idade:			
Raça:		Peso:			
Dia:		Nº da coleta:			
Exame geral/Palpação:					
Conduta Sexual: () Questionável () Bom () Muito Bom () Excelente Pontuação:					
EXAME DO SISTEMA GENITAL: TESTÍCULO E ESCROTO Simetria Consistência Mobilidade () Simétrico () Não simétrico () Tensa-elástica () Flácida () Firme () Sim () Não Em caso de alteração (ex. dor) descrever:					
Perímetro escrotal (cm):		Espessura:			
		TD: TE:			
		Comprimento:			
		TD: TE:			
AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICA DO SÊMEN: Volume (ml): _____ Aparência: () Cremosa () Leitosa () Aquosa Cor: () Esbranquiçada () Branca () Amarelada () Outras _____					
AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO SÊMEN:					
Movimento de massa		Motilidade:			
		Vigor:			
		Concentração (ml):			
Teste de termo-resistência (TTR)					
Tempo-30min Mot:		Tempo-90min Mot:			
Tempo-60min Mot:		Tempo-120min Mot:			
Tempo-150min Mot:		Tempo-180min Mot:			
Vigor:		Vigor:			
Vigor:		Vigor:			
Vigor:		Vigor:			
Teste hiposmótico (integridade de membrana): Nº de spzz integro: _____ Nº de spz com cauda dobrada: _____ % cauda dobrada: _____ Calculo: %cauda dobrada (____) - %patologia de cauda (____) = _____					
Morfologia espermática (patologia)					
Defeitos Menores	a-Cabeça delgada		Defeitos Maiores	Acrossoma	
	b-Cabeça pequena normal			A-Gota citoplasmática proximal	
	c-Cabeça larga			B-Cabeça subdesenvolvida	
	d-Cabeça gigante			C-Cabeça piriforme	
	e-Cabeça curta			D-Cabeça estreita na base	
	f-Cabeça isolada normal			E-Cabeça isolada patológica	
	g-Inserção de cauda abaxial			F-Cabeça pequena anormal	
	h-Inserção cauda retroaxial/oblíqua			G-Cabeça contorno normal	
	i-Cauda dobrada ou enrolada			H-"Pouch formation",	
	j-Gota citoplasmática distal			I-Formas teratogênicas	
	k-Destacamento de acrossoma			J-Patologias da peça intermediária	
Total de defeitos espermáticos em %			Obs:	K-Cauda forte. enrolada/dobrada	
Defeitos Menores				L-Cauda enrolada na cabeça	
Defeitos Maiores				M-Cauda dobrada com gota distal	
Defeitos Totais					

