



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO OLIVEIRA LOPES SILVA

**AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA E ULTRASSONOGRRAFIA
TESTICULAR DE TOURINHOS SUBMETIDOS À
SUPLEMENTAÇÃO INJETÁVEL DE VITAMINAS E
MINERAIS**

Londrina
2022

LEONARDO OLIVEIRA LOPES SILVA

**AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA E ULTRASSONOGRRAFIA
TESTICULAR DE TOURINHOS SUBMETIDOS À
SUPLEMENTAÇÃO INJETÁVEL DE VITAMINAS E
MINERAIS**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Clínicas Veterinárias da
Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Morotti

Londrina

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S586a Silva, Leonardo Oliveira Lopes .
Avaliação espermática e ultrassonografia testicular de tourinhos submetidos à suplementação injetável de vitaminas e minerais / Leonardo Oliveira Lopes Silva. - Londrina, 2022.
55 f. : il.

Orientador: Fábio Morotti.
Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Tese. 2. Brangus - Tese. 3. Doppler - Tese. 4. Hemodinâmica artéria suprategicular - Tese. I. Morotti, Fábio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

CDU 619

LEONARDO OLIVEIRA LOPES SILVA

**AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA E ULTRASSONOGRRAFIA
TESTICULAR DE TOURINHOS SUBMETIDOS À
SUPLEMENTAÇÃO INJETÁVEL DE VITAMINAS E
MINERAIS**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Clínicas Veterinárias da
Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Clínicas Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Morotti
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Prof. Orientador:

Prof.^a Dra. Priscilla Fajardo Valente Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Denis Vinicius Bonato
Universidade Paranaense - UNIPAR

Londrina, ____ de ____ de ____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força em todos os momentos de fraqueza;

Aos meus pais, Marcio Lopes da Silva e Eleusa Martins de Oliveira Lopes, pelo amor, compreensão, dedicação e por acreditarem nas minhas escolhas sempre. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Marcio Lopes da Silva Junior e Rafael Bruno Oliveira Lopes Silva, por serem meus melhores amigos e me auxiliarem nas tomadas de decisões, sou grato por ter vocês em minha vida;

A minha família, em especial a minha vovó Maria (in memoriam) e ao meu avô Miguel, pela dedicação e cuidado com os seus netos.

A minha namorada, Carolina Luiz Paduano, minha fonte de inspiração diária. Obrigado por todo o auxílio na dissertação e, também, por se preocupar e cuidar de mim, amo-te;

Ao meu grande amigo e parceiro de vida, Higor Souza de Camargo, que participou de todo o projeto, sendo uma peça fundamental no desenvolvimento deste trabalho, exemplo de profissionalismo, humildade e bom-humor;

Ao meu orientador, professor Fábio Morotti, pelo conhecimento e por me auxiliar em toda a trajetória da pós-graduação, não medindo forças para me ajudar nessa jornada, exemplo de pessoa e profissional.

Aos professores do programa de pós-graduação da UEL;

Aos funcionários da Brawir, por disponibilizarem os animais e nos auxiliarem no manejo dos touros;

Aos residentes, mestrandos, doutorandos e estagiários do laboratório de reprodução animal da UEL – REPROA;

A professora Priscilla Fajardo e ao professor Denis Vinicius por terem aceitado o convite de participarem da banca examinadora.

Às minhas queridas amigas veterinárias, Tainá Costa, Paula Maciel e Nathalia Gomes, pelos conselhos e por alegrar o meu dia a dia, obrigado pela amizade de vocês.

A todas as pessoas, colegas e amigos que contribuíram de forma direta e indiretamente como o meu trabalho e que não foram mencionadas acima; e

Aos animais que participaram do experimento;

Muito obrigado.

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe, Eleusa Martins de Oliveira Lopes, fonte de muita sabedoria, amor, coragem e fé.

SILVA, Leonardo Oliveira Lopes. **AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA E ULTRASSONOGRRAFIA TESTICULAR DE TOURINHOS SUBMETIDOS À SUPLEMENTAÇÃO INJETÁVEL DE VITAMINAS E MINERAIS**. 2022. 55 f. Dissertação (Mestrado em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação parenteral de vitaminas e minerais na produção e qualidade espermática, bem como as alterações na hemodinâmica da artéria suprategesticular de tourinhos da raça Brangus (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). Foram utilizados 28 animais hípidos, com idade aproximada de 15 meses. O peso médio dos animais inclusos foi de 339 kg \pm 38,6. Os animais foram divididos igualmente e de forma aleatória em grupo Controle e Tratamento. Ambos os grupos foram mantidos em área de pastagem composta por *Brachiaria brizantha* cv *marandu*, além de receberem 0,8 a 1 kg de concentrado energético por animal e acesso a água e sal mineral *ad libitum*. O grupo Tratamento ($n=14$) recebeu suplementação de vitaminas (Kit Adaptador Vit®) e minerais (Kit Adaptador Min®) através de aplicação subcutânea, nas dosagens de 1mL / 50 kg de peso vivo e de 1mL / 75 kg de peso vivo, respectivamente. O grupo Controle ($n=14$) recebeu através de aplicação subcutânea solução de NaCl 0,9% nas mesmas dosagens do grupo tratamento. As aplicações foram realizadas no D-60 e D0. A avaliação espermática e ultrassonográfica da artéria suprategesticular foram realizadas em D-60, D0 e D60. O sêmen foi avaliado quanto à sua cor, odor, aparência, volume (mL), turbilhonamento (0-5), motilidade (0-100%), vigor (0-5), concentração (sptz/ml) e morfologia espermática. Já na ultrassonografia Doppler, foi avaliado os índices dopplervelocimétricos (velocidade média, índice de resistividade e índice de pulsatilidade) da artéria suprategesticular. Para análise estatística os dados foram previamente analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste F. Para cada variável estudada, o efeito de tratamento foi analisado por ANOVA, empregando Modelo Linear Generalizado (GLM). Na presença de efeito significativo, foi empregado o teste de Tuckey. Adotou-se nível de significância de 5% para indicar o efeito das variáveis categóricas e suas interações. Não houve diferença significativa nos parâmetros espermáticos de turbilhão, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática entre os dias de avaliação. Não foram evidenciadas alterações na velocidade média, Índice de Resistividade e Índice de Pulsatilidade através da ultrassonografia Doppler após 120 dias da primeira aplicação da suplementação. Portanto, a suplementação injetável de vitaminas e minerais não surtiu efeito na produção e qualidade espermática, bem como não alterou a hemodinâmica da artéria suprategesticular.

Palavras-chave: Bovino; Brangus; Doppler; Hemodinâmica da artéria suprategesticular

SILVA, Leonardo Oliveira Lopes. **SPERM EVALUATION AND TESTICULAR ULTRASONOGRAPHY OF BULLS SUBMITTED TO VITAMIN AND MINERAL INJECTABLE SUPPLEMENTATION**. 2022. 55p. Dissertation (Master's degree in Veterinary Clinics) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of parenteral vitamin and mineral supplementation on sperm quality and production in Brangus bulls (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). Twenty-eight healthy animals with an approximate age of 15 months were used. Mean weight of the included animals was 339 kg ± 38.6. The animals were equally and randomly divided into Control and Treatment groups. Both groups were kept in a grazing area composed of *Brachiaria brizantha* cv *marandu*, and also received 0.8 to 1 kg of energetic concentrate per animal body weight and access to water and mineral salt ad libitum. Treatment group (n=12) received vitamin (Kit Adaptador Vit®) and mineral (Kit Adaptador Min®) supplementation through subcutaneous application, in dosages of 1 mL / 50 kg body weight and 1 mL / 75 kg body weight, respectively. Control group (n=13) was given 0.9% NaCl solution subcutaneously in the same dosages as the treatment group. The applications were performed on D-60 and D-0. Sperm evaluation and ultrasonography of the supra-testicular artery were performed on D-60, D0 and D60. Semen was evaluated for color, odor, appearance, volume (mL), turbulence (0-5), motility (0-100%), vigor (0-5), concentration (sptz/ml) and sperm morphology. Doppler ultrasonography was used to evaluate the Doppler velocity, resistivity and pulsatility indices of the supra-testicular artery. For statistical analysis data were previously checked for normality of distribution using the Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variance by the F-test. For each variable studied, the treatment effect was analyzed by ANOVA, using a Generalized Linear Model (GLM). In the presence of a significant effect, the Tuckey test was used. A 5% significance level was adopted to indicate the effect of the categorical variables and their interactions. There were no significant differences in the sperm parameters of whirlpool, motility, vigor, concentration and sperm morphology between evaluation days. No changes were evidenced in mean velocity, Resistivity Index and Pulsatility Index by Doppler ultrasonography 120 days after the first supplementation application. Therefore, vitamin and mineral injectable supplementation had no effect on sperm production and quality and did not alter the hemodynamics of the supra-testicular artery.

Key-words: Bovine; Brangus; Doppler; Hemodynamics of the supra-testicular artery

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Sistema reprodutor do touro.....16
- Figura 2** Diferenciação celular e formação dos espermatozoides nos túbulos seminíferos.....18
- Figura 3** Ultrassonografia Color Doppler da artéria supratesticular.....28
- Figura 4** Delineamento experimental para avaliar o efeito da suplementação parenteral com complexo de vitaminas e minerais sobre os parâmetros espermáticos de tourinhos Brangus.....33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Ocorrência de puberdade em tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de mineral e vitaminas a cada rodada de avaliação do estudo.....38
- Tabela 2** Volume e cinética espermática de tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de vitaminas e minerais a cada rodada de avaliação do estudo.....;.....40
- Tabela 3** Concentração e morfologia espermática de tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de vitaminas e minerais a cada rodada de avaliação do estudo.....41
- Tabela 4** Velocidade média, Índice de Pulsatilidade e Índice de Resistividade da artéria supratesticular de tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de vitaminas e minerais a cada rodada de avaliação do estudo.....44

LISTA DE SIGLAS

ABP	Proteína de Ligação ao Andrógeno
Cu	Cobre
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 1
LH	Hormônio Luteinizante
Mn	Manganês
IP	Índice de Pulsatividade
IR	Índice de Resistividade
Se	Selênio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2 - REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Órgãos Reprodutores e Glândulas Acessórias	15
2.2 Espermatogênese.....	17
2.3 Endocrinologia Reprodutiva	19
2.3.1 Puberdade	20
2.4 Exigências Nutricionais na Reprodução.....	21
2.5 Energia e Proteína.....	21
2.6 Vitaminas.....	22
2.7 Minerais	24
2.7.1 Zinco (Zn).....	24
2.7.2 Manganês (Mn)	25
2.7.3 Selênio (Se)	26
2.7.4 Cobre (Cu)	26
2.8 Ultrassonografia Color Doppler	26
2.8.1 Ultrassonografia testicular	28
3 - HIPÓTESE.....	30
4 - OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo Geral	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5 - MATERIAL E MÉTODOS	32
5.2 Local, Animais e Manejo	32
5.2.2 Tratamentos e Delineamento	32
5.3 Exame Andrológico.....	33
5.4 Colheita de Sêmen	34
5.5 Espermograma.....	34
5.6 Ultrassonografia	36
5.7 Análise Estatística.....	36
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
7 - CONCLUSÃO.....	45
8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 - INTRODUÇÃO

A demanda por touros a campo permanece elevada no Brasil, conforme demonstram os dados de comercialização de sêmen bovino fornecidos pela Associação Brasileira de Inseminação Artificial: no ano de 2021 foram comercializadas 25.449.957 doses de sêmen bovino para o cliente final, o que é referente a 22,79% das matrizes inseminadas no Brasil. No entanto, apesar do crescimento da aderência ao uso de biotecnologias reprodutivas, como a Inseminação Artificial, é importante ressaltar que a maior porcentagem das fêmeas bovinas em idade reprodutiva ainda é submetida ao método tradicional, utilizando monta natural (ASBIA., 2021; BARUSELLI et al., 2019).

No Brasil, o sistema de produção majoritariamente adotado é o extensivo, tendo como fonte de alimentação as pastagens (CEZAR et al., 2005). A produção de alimentos neste sistema sofre influência do clima (NEIVA, 2000), sendo o período de seca uma fase de baixa oferta de alimentos e, conseqüentemente, de desafios à fisiologia dos animais.

Dentro da bovinocultura, tem grande importância o desempenho genético dos touros utilizados em atividades reprodutivas. Este desempenho por sua vez sofre influência de fatores como alimentação, manejo e condições ambientais (ROSA et al., 2013). Desta forma, em condições de baixa oferta de alimentos, como descrito anteriormente, pode ser necessária a suplementação nutricional dos bovinos.

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

Estudos relacionados aos efeitos da suplementação de vitaminas e minerais na espermatogênese do touro púbere são escassos na literatura, todavia, compreender os efeitos da suplementação no ciclo da espermatogênese é fundamental no direcionamento de medidas mais efetivas no manejo nutricional desses animais.

Além destes pontos, para que os touros desempenhem suas funções reprodutivas, estes devem apresentar fertilidade adequada e, para avaliação desta, é essencial a realização de exame andrológico, que auxilia no diagnóstico de anomalias reprodutivas que afetam a qualidade espermática (SILVA et al., 1993).

A ultrassonografia é um exame complementar utilizado para auxiliar no diagnóstico de alterações nos testículos e glândulas sexuais acessórias, fornecendo imagens em tempo real da anatomia do órgão examinado (CARDILLI et al., 2012). A ultrassonografia color Doppler permite avaliar a vascularização dos testículos, apresentando informações sobre a arquitetura vascular, direção e fluxo sanguíneo dos tecidos (LAM et al 2005). Podendo também demonstrar alterações na perfusão sanguínea (BUMIN et al., 2007) e ser referência como marcador de qualidade espermática (ZELLI et al., 2013).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação parenteral de vitaminas e minerais na produção e qualidade espermática de tourinhos da raça Brangus por um período de 120 dias, compreendendo ciclos completos da espermatogênese e avaliando os seus efeitos na hemodinâmica da artéria supratesticular através da ultrassonografia Doppler.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Órgãos Reprodutores e Glândulas Acessórias

O sistema genital masculino dos bovinos é constituído por diversos órgãos: dois testículos suspensos no escroto por um cordão espermático e músculo cremaster; epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias e pênis (STANBENFELD e EDQVIST, 1996). Em conjunto estes órgãos (figura 1) são responsáveis por produzir os gametas masculinos e liberá-los no sistema reprodutor da fêmea. Um dos aspectos característicos dos touros é a presença da flexura sigmoide, estrutura que se estende durante a ereção para manter o pênis exposto (STANBENFELD e EDQVIST, 1996).

Os testículos são uma gônada dupla, de formato oval ou alongada, simétricas e de consistência fibro-elástica, situados dentro do escroto, com localização anatômica inguinal e posição vertical. Possui duas funções primordiais: a produção espermática e atividade endócrina (HAFEZ, 2004). O tamanho e o formato podem variar conforme a idade, raça e genética dos touros (FAYRER-HOSKEN, 1997)

O escroto é uma estrutura cutânea de dois compartimentos, sendo dividida em túnica dartos (músculos lisos que auxiliam na termorregulação testicular), túnica vaginal (revestimento peritoneal que se desloca junto ao testículo durante a sua migração peritoneal) e túnica albugínea (tecido conjuntivo espesso que envolve a massa testicular e separa os testículos através de septos no interior do escroto (HAFEZ, 2004).

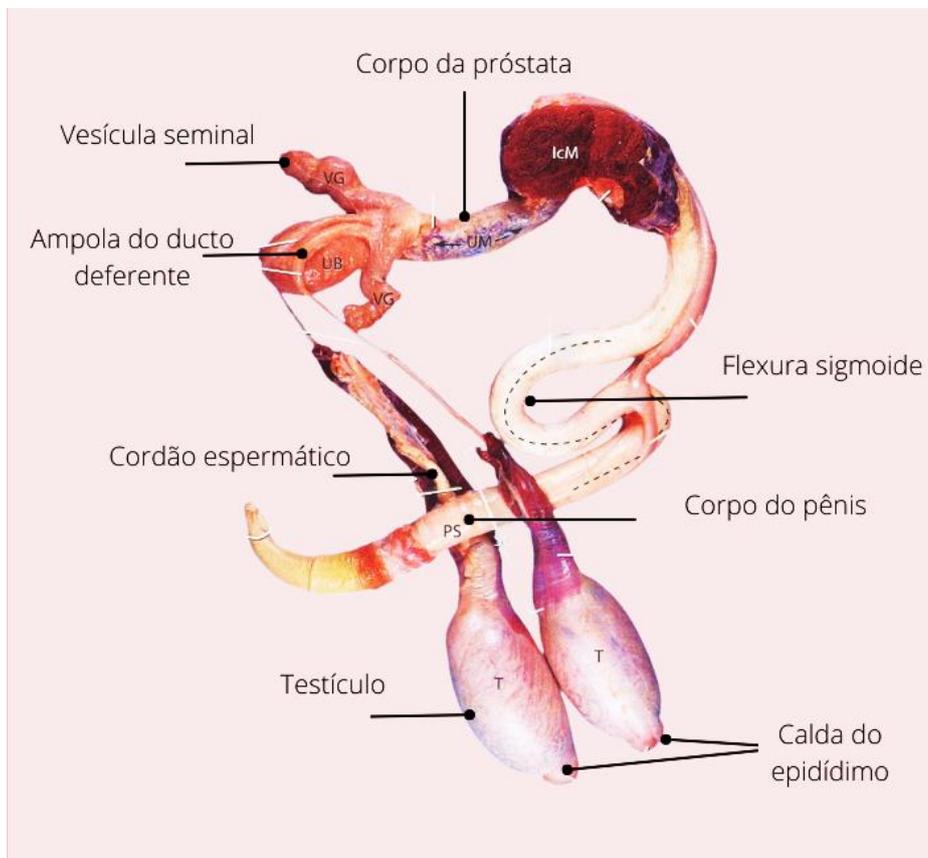
O cordão espermático é uma estrutura composta por artéria testicular, plexo venoso pampiniforme, veias testiculares, vasos linfáticos e nervos autônomos. Os vasos do plexo pampiniforme formam um sistema de grande importância na regulação da temperatura dos testículos (FAYRER; HOSKEN, 1997).

Os mecanismos de termorregulação testicular desempenham um papel importante na manutenção da temperatura dos testículos de 4 a 6 °C abaixo da temperatura corpórea (KASTELIC et al., 1997). A troca de calor contracorrente, regulação do fluxo sanguíneo, posicionamento dos testículos e sudorese são

alguns destes mecanismos. Entretanto, o plexo pampiniforme presente no funículo espermático destaca-se como o principal fator de controle de temperatura dos testículos.

As veias do plexo pampiniforme são espiraladas e longas e situam-se ao redor da artéria testicular. Por esta característica anatômica, a artéria testicular possui maior área de contato e proporciona uma redução do fluxo sanguíneo arterial, aumentando o contato com o sangue venoso (BRITO et al., 2004).

Figura 1 – Sistema reprodutor do touro



Fonte: Adaptado de SENGER, (2018).

O mecanismo de troca de calor contracorrente permite a dissipação da temperatura do sangue arterial antes de chegar aos testículos, bem como o aquecimento do sangue venoso com fluxo em direção à cavidade abdominal, aproximando a temperatura testicular à temperatura corporal (SETCHELI et al., 1971)

O epidídimo é um ducto enrolado e subdividido em três partes: cabeça, corpo e cauda. A estrutura é formada por um epitélio pseudoestratificado

complexo (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2014). Possui a função de armazenamento e maturação dos espermatozoides, que permanecem armazenados por aproximadamente 10 dias na cauda do epidídimo, até serem ejaculados. Quando não liberados são reabsorvidos ou eliminados na urina (AMMAN e SCHANBACHER 1983).

As glândulas sexuais acessórias são responsáveis pela produção do plasma seminal, compondo a parte de maior volume no ejaculado, tendo como funções conduzir os espermatozoides pelo trato genital da fêmea e fornecer condições bioquímicas adequadas aos espermatozoides fora do sistema reprodutor masculino. As glândulas sexuais acessórias são: ampola do ducto deferente, vesícula seminal, próstata e bulbouretral (FRANDSON; LEE WILKE; DEE FAILS, 2005).

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de formação e desenvolvimento dos espermatozoides, que se inicia nos testículos e tem duração aproximada de 60 dias (RUSSELL et al., 1990, FILHO, 2006). O processo é ilustrado na Figura 2.

Na fase embrionária, após a diferenciação sexual, ocorre a formação das células germinativas e, posterior ao início da puberdade, há a proliferação das espermatogônias através de divisões mitóticas. As espermatogônias são células diploides ($2n$), diferenciadas em dois grupos celulares: espermatogônia do tipo A, células com capacidade de continuar sofrendo mitose e mantendo a população que possam dar origem a novas espermatogônias; e espermatogônia do tipo B, células que possuem capacidade de entrar no ciclo de meiose, sendo precursores dos espermatócitos primários (JOHNSTON et al., 2001).

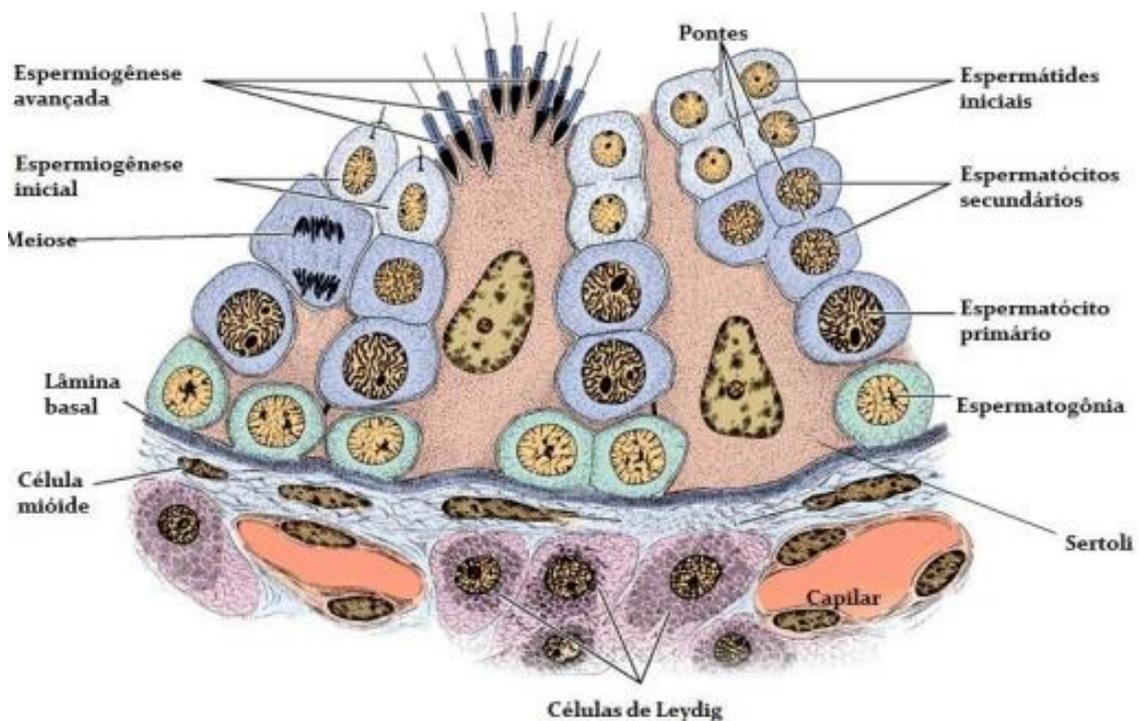
A passagem da espermatogônia tipo B para o espermatócito primário é caracterizada pelo aumento do volume citoplasmático. O espermatócito primário sofre a primeira divisão meiótica, ocorrendo a separação dos cromossomos homólogos, e então, formando dois espermatócitos secundários haploides (n). Os espermatócitos secundários realizam uma segunda divisão meiótica, havendo a separação das cromátides irmãs, formando duas espermátides haploides de tamanho semelhante (NETO et al., 2016). Esta fase de

diferenciação celular é denominada espermatogênese e possui duração de aproximadamente 45 dias (GARNER; HAFEZ, 2004).

A transformação das espermatídias em espermatozoides é denominada espermiogênese, sendo uma etapa de intensa diferenciação celular e de mudanças morfofuncionais (AMANN; SCHANBACHER, 1983). Ao final da espermatogênese, cada espermatogônia diploide dará origem a quatro espermatozoides haploides e maduros.

A espermiogênese compreende uma série de processos, como a modificação do tamanho do núcleo celular, devido a condensação da cromatina; formação do acrossomo pelo complexo de golgi; formação da cauda, reorganização das mitocôndrias na peça intermediária e redução do volume citoplasmático (KNOLBIL; NEIL, 1993).

Figura 2 – Diferenciação celular e formação dos espermatozoides nos tubulos seminíferos



Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, (2013).

Na maturação ocorrem as transformações finais das espermatídias em espermatozoides, que serão liberados para o lúmen dos túbulos seminíferos. Os espermatozoides após a diferenciação ainda não possuem poder de fecundação, sendo necessária sua maturação (HAFEZ, 2004).

Os espermatozoides são liberados progressivamente dos túbulos seminíferos para os túbulos retos. A maturação espermática ocorre no epidídimo, sendo uma fase de modificações funcionais que incluem o desenvolvimento da potencialidade para manter a motilidade, a perda progressiva de água e a migração distal da gota citoplasmática (GARNER; HAFEZ, 2004). Ao final da maturação, os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo até o momento da ejaculação (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

Os espermatozoides possuem duas regiões morfológicas e com funcionamentos distintos, entretanto, são envoltas por uma única membrana plasmática. O material genético e o acrossoma estão presentes na cabeça do espermatozoide; as mitocôndrias estão na peça intermediária; e a cauda inicia na peça intermediária, indo até a porção final do espermatozoide (ALBERTS, 2008).

2.3 Endocrinologia Reprodutiva

O funcionamento do sistema reprodutivo é fundamentado na comunicação entre adeno-hipófise, gônadas e células alvos (SOEDE et al., 2011). A produção de gonadotrofinas tais como o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) pela adeno-hipófise é estimulada pelo Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) produzido no hipotálamo (JONES; HUNT; KING, 2007). Os hormônios gonadotróficos atuam nas gônadas masculinas, sendo o LH responsável por interagir com as células de Leydig, estimulando a conversão do colesterol em testosterona (O'DONNELL et al., 2001).

Altas concentrações de testosterona são necessárias para a espermatogênese (STAMBENFELD e EDQVIST, 1996) e, devido essa necessidade, as células de Sertoli são responsáveis pela produção da Proteína de Ligação ao Andrógeno (ABP), que se liga a testosterona e aumenta a concentração desse hormônio nos túbulos seminíferos (CHENOWETH; KASTELIC, 2007).

O FSH estimula uma maior atividade das células de Sertoli, convertendo a testosterona em estradiol e secretando hormônios reguladores como a inibina e a ativina (HAFEZ, 2004).

A inibina realiza o controle do FSH através de feedback negativo, enquanto a ativina atua de forma distinta, estimulando a produção de FSH pela hipófise (OONK et al., 1998). O estradiol inibe a produção dos hormônios gonadotróficos, realizando feedback negativo, coibindo a secreção de GnRH e a produção de LH e FSH (CHENOWETH; KASTELIC, 2007).

2.3.1 Puberdade

A puberdade possui diversas definições, podendo ser o momento em que há produção de espermatozoides, do início do interesse sexual e da capacidade de realizar um serviço completo (VALE FILHO et al., 1993; FRENEAU, 1996).

Hafez (2004) define a puberdade como a junção entre as atividades gonadotróficas em crescimento e capacidade das gônadas em apresentar a esteroidogênese e a gametogênese. A fase de puberdade é caracterizada pelo crescimento dos testículos, alterações nos padrões de liberação de LH e conseqüentemente, maior concentração de testosterona plasmática (BALL; PETERS, 2006), além de ser o período em que há início da espermatogênese e aparecimento dos sinais de interesse sexual. Porém, atualmente o conceito mais utilizado não está associado apenas com o aparecimento dos primeiros espermatozoides no sêmen, mas baseado na qualidade seminal (SILVA 2009). Os parâmetros de referência para qualidade seminal consistem em ejaculado com concentração espermática de 50×10^6 espermatozoides/ejaculado e, no mínimo, 10% de motilidade espermática (WOLF et al., 1965).

Contudo, deve-se observar diversos fatores para determinar a puberdade dos machos bovinos. Existem diferenças entre as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, sendo esta última mais tardia quando comparada aos animais europeus, que levam em média de 18 a 21 meses para atingir a puberdade (DODE et al, 1989) Além da raça, a puberdade está associada a fatores genéticos, às condições nutricionais, e ao manejo (GARCIA et al., 1987).

Hafez (2004) descreve que o peso possui significativa relação com a puberdade, bovinos atingem a puberdade quando o seu peso corpóreo compreende cerca de 40 a 50% do seu peso adulto. É importante ressaltar que a nutrição tem impacto na atividade hormonal dos animais, e uma

alimentação deficiente retarda o seu desenvolvimento, levando ao atraso da puberdade (HAFEZ, 2004; MARTIN et al., 2010).

2.4 Exigências Nutricionais na Reprodução

O equilíbrio nutricional é fundamental para que os animais possam desempenhar suas funções fisiológicas de forma adequada, sendo de grande importância determinar os requerimentos de energia, proteínas, minerais e vitaminas nas dietas dos bovinos (TUFARELLI et al., 2011).

Atualmente, sabe-se que a espermatogênese é influenciada pelo estado de nutrição, sendo mais perceptível em animais no período de crescimento, pois é quando a ocorrência de deficiência nutricional atrasa o desenvolvimento do sistema reprodutor, podendo ocasionar puberdade tardia (MARTIN et al., 2010).

2.5 Energia e Proteína

O consumo de energia aumenta os níveis de glicose, insulina e Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 1 (IGF-1) favorecendo o estímulo na produção de GnRH, e aumentando a produção de LH (DANCE et al., 2015).

A deficiência de energia e proteínas na alimentação de bovinos é mais comum em animais criados de forma extensiva, em que a oferta de alimentos está associada ao clima, sendo os períodos de seca a fase de menor disponibilidade de forrageiras, comprometendo o consumo de nutrientes e a manutenção corporal (NEIVA, 2000).

A subnutrição afeta mecanismos endócrinos ligados diretamente à reprodução, interferindo na secreção das gonadotrofinas hipofisárias e nos níveis de testosterona plasmática, levando à alterações testiculares (Short & Adams 1988, HAFEZ 2004). Em caso de deficiência de nutrientes por períodos prolongados, pode ocorrer quadros de infertilidade (NICODEMO, 2008).

Uma alternativa nos períodos de baixa oferta de alimentos é a suplementação com fontes de energia e proteína, evitando perdas produtivas importantes durante a estação de seca (SUSIN, 1996)

A suplementação utilizando concentrado energético durante a estação reprodutiva resultou em aumento das concentrações séricas de colesterol (GRESSLER et al., 2015), ganho de peso e aumento no escore corporal dos animais, resultando em um rebanho padronizado e com melhor desempenho reprodutivo (GOTTARDI et al., 2014).

O fornecimento de suplementos como ervilha, aveia e grão de tremoço proporcionou melhora em diversos parâmetros reprodutivos, aumentando o volume do ejaculado (GUAN et al., 2014; TUFARELLI et al., 2011), maior concentração de espermatozoide por ejaculado (GUAN et al., 2014b), aumento na integridade de membrana plasmática dos espermatozoides (SELVARAJUA et al., 2012) e intensificação da cinética espermática (GUAN et al., 2014; SELVARAJUA et al., 2012; TUFARELLI et al., 2011).

Dance (2015) relatou que os animais que receberam alta concentração de energia e proteína obtiveram picos de maior magnitude de LH, além de maior concentração de testosterona, levando a uma maior resposta do GnRH e elevado nível de IGF-1, quando comparado a touros que receberam uma dieta de baixa concentração de energia e proteínas.

2.6 Vitaminas

Vitaminas são moléculas que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, agindo na transformação de energia, reações metabólicas, crescimento e manutenção de tecidos (GONZÁLES, 2019).

As vitaminas podem ser produzidas pelos próprios animais, como também serem obtidas através da alimentação. Elas são classificadas conforme a solubilidade, podendo ser hidrossolúveis, ou seja, que possuem solubilidade em água, inclusas neste grupo as vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, B12), ácido nicotínico, ácido fólico, biotina, colina e ácido ascórbico. Já as lipossolúveis são solúveis em lipídios e solventes orgânicos, as vitaminas A, D, E e K estão inseridas nesse grupo (GONZÁLES, 2019). Dentre elas, as vitaminas A e E possuem papel de destaque na reprodução animal.

2.6.1 Vitamina A

A vitamina A, está ligada ao crescimento e proliferação de células epiteliais (MEDEIROS & PAULINO, 1999), além de proteger o epitélio germinativo do macho e estabilizar a integridade das membranas celulares (LIVERA et al, 2002), inclusive tendo ação em determinados estágios da formação do espermatozoide. Há evidências de que os betacarotenos, juntamente com o manganês e zinco, estão envolvidos na esteroidogênese (SMITH & AKINBAMIJO, 2000).

A deficiência de vitamina A leva à degeneração testicular, sendo o seu efeito decorrente da supressão de liberação das gonadotrofinas hipofisárias (HAFEZ, 1995). Foram registrados atraso na puberdade e redução de libido nos machos com deficiência de vitamina A (SMITH & AKINBAMIJO, 2000).

Palludan, (1963) observou que cachaaos deficientes em vitamina A, apresentaram atrofia do testículo e mudanças qualitativas do sêmen relacionadas à interrupção parcial ou total da espermatogênese. Redução dos níveis basais de testosterona foi observada em ratos com avitaminose A (APPLING & CHYTIL, 1981).

Em contrapartida, Martins (2009), utilizou reprodutores distribuídos em dois grupos: controle, recebendo raação com 10.000 UI de Vitamina A e tratamento, recebendo raação com 16.000 UI de vitamina A. Após análise, não encontrou diferença significativa da suplementação de vitamina A nos parâmetros de volume, cinética e morfologia espermática quando comparados os grupos tratamento e controle. Porém, foi detectado diferenças numéricas nos valores de motilidade e de espermatozoides vivos quando comparado ao grupo controle do experimento, sugerindo que possa haver efeitos decorrente da maior quantidade oferecida de vitamina A.

2.6.2 Vitamina E

A vitamina E se refere a um grupo de tocoferóis e tocotrienóis com atividade antioxidante, sendo o α – tocoferol a forma de maior abundância na natureza e de maior atividade biológica (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999). Atua como um potente antioxidante lipossolúvel e tem a capacidade de impedir

lesões oxidativas nas membranas celulares, reagindo e removendo radicais peróxido (LOO) e inibindo a reação de lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Apesar do potencial de efeito antioxidante sobre os espermatozoides relatado em literatura, Marinho (2016) não encontrou diferença significativa realizando a suplementação oral de touros que já possuíam as exigências vitamínicas atendidas. Chacur et al. (2010), também não encontraram diferença de motilidade espermática em touros suplementados por via oral durante 70 dias com produto nutracêutico comercial contendo vitamina E em sua composição.

Porém, Hatamoto (2006) evidenciou uma melhora na motilidade espermática em animais submetidos a condições estressantes, após adição de suplementos com vitamina E a alimentação destes animais.

Touros alimentados com 14 mg/kg de gossipol livre/kg na ração e suplementados com vitamina E obtiveram aumento na quantidade de espermatozoides normais, aumento no percentual de motilidade e diminuição de anormalidades de peça intermediária quando comparado aos animais do grupo controle, que receberam apenas o gossipol na ração sem a suplementação de vitamina E (VELASQUEZ-PEREIRA, 1999). Os achados neste estudo evidenciam a hipótese de que o tocoferol reduz os efeitos deletérios do gossipol através de sua ação protetora de membrana.

2.7 Minerais

Os minerais estão relacionados direta ou indiretamente às funções fisiológicas dos animais, e sua deficiência é capaz de alterar o metabolismo e causar danos à saúde e também ao desempenho reprodutivo dos touros (SILVA, 1993). Certos minerais possuem maior capacidade de influenciar nos parâmetros reprodutivos, e por isso tendem a ser mais utilizados em alguns suplementos comerciais.

2.7.1 Zinco (Zn)

O Zn durante a fase de espermiogênese, liga-se aos grupamentos sulfídricos das cisteínas e auxilia a compactação das protaminas, protegendo-as de processos oxidativos (DADOUNE, 1993). Ele está presente em grande

quantidade no plasma seminal e também nos espermatozoides. O Zn disponibilizado pela próstata assegura que ocorra a estabilidade da integridade genômica do espermatozoide (KAJI, 2001). Concentração insuficiente de Zn no núcleo pode desestabilizar a cromatina, reduzindo o conteúdo de DNA do espermatozoide e, conseqüentemente, diminuindo a sua capacidade de fertilização (QUINN, 1968; KVIST et al., 1988).

A deficiência deste mineral pode levar a quadros de disfunção gonadal, falha na espermatogênese, redução na secreção de testosterona e atrofia dos túbulos seminíferos (KAJI, 2001).

O hipogonadismo decorrente da deficiência de Zn está relacionado à baixa resposta das células de Leydig às gonadotrofinas. Os efeitos da deficiência alimentar do Zn são mais acentuados em animais jovens, durante a fase puberal (HIDIROGLOU & KNIPFEL, 1984).

Oliveira et al., (2004) conduziu um estudo para avaliação dos efeitos da suplementação de Zn em dois grupos de animais, ambos os grupos permaneceram em regime extensivo, se alimentado de forrageiras (*Brachiaria brizantha*), e recebendo diariamente, durante dois anos, sal mineral suplementado com Zn (grupo tratamento) e sem Zn (grupo controle). A suplementação de Zn afetou significativamente a qualidade seminal dos animais que receberam a suplementação quando comparado aos animais do grupo controle (OLIVEIRA et al., 2004). Fernandes et al. (2009), evidenciaram que touros mantidos a campo, provenientes de rebanhos com deficiência na suplementação em Zn, estão sujeitos à redução da qualidade seminal.

2.7.2 Manganês (Mn)

A deficiência de Mn ocasiona a inibição da síntese de colesterol e de seus precursores, limitando a síntese de hormônios sexuais. Isso ocorre pois o Mn é um mineral constituinte de uma metaloenzima que está ligada a síntese de esteroides, sendo a farnesilpirofosfato-sintetase ativada pelo manganês (HURLEY; DOANE, 1989).

A falta desse mineral pode acarretar quadros de degeneração testicular, diminuição do volume do ejaculado e redução na motilidade e no número de espermatozoides (NICODEMO, 2008).

Estudos desenvolvidos com ratos demonstraram que o manganês atua diretamente no hipotálamo, estimulando a secreção de LH. Esse estímulo proporciona maior produção de testosterona pelas células de Leydig, provocando aumento na espermatogênese e acelerando o início da puberdade (LEE et al., 2006).

2.7.3 Selênio (Se)

A deficiência de Se causa estresse oxidativo nos testículos devido a diminuição da atividade antioxidante da glutadiona-peroxidase dependente de Se. A glutadiona é uma enzima abundante no meio intracelular, e o Se atua como cofator dessa enzima, que protege as células contra ações oxidativas. Além disso, é um mineral que está relacionado com o metabolismo de vitamina E (KAUSHAL & BANSAL, 2007).

Marin-Guzman et al. (2000) identificaram que suínos alimentados com dieta deficiente em Se apresentaram anomalias na peça intermediária do espermatozoide, principalmente nas mitocôndrias e, também, um maior número de defeitos citoplasmáticos.

2.7.4 Cobre (Cu)

Em touros, o Cu na dieta melhora a qualidade do sêmen, sendo a melhora associada à motilidade e ao menor número de espermatozoides mortos. Entretanto não há evidências claras sobre a relação de Cu sanguíneo, a concentração de cobre hepático e a fertilidade (HIDIROGLOU & KNIPFEL, 1984).

2.8 Ultrassonografia Color Doppler

A ultrassonografia Color Doppler é um método não invasivo que permite obter informações sobre a arquitetura vascular de órgãos e tecidos, além de avaliar a direção e velocidade do fluxo sanguíneo (LAM et al., 2005). O efeito

Doppler permite quantificar a velocidade do movimento relativo entre a fonte do fenômeno e o observador. O efeito é representado por uma imagem colorida que se sobrepõe a imagem real do modo bidimensional (MERRITT, 1999). O movimento das células sanguíneas é responsável pelo efeito Doppler, e fornecem informações sobre a presença e direção do fluxo sanguíneo, bem como possíveis alterações na frequência do sinal.

O movimento das células é representado através das cores vermelha e azul, variando suas tonalidades conforme a velocidade do fluxo (CARVALHO, 2009). Por convenção a cor vermelha foi definida para identificar o fluxo em direção ao transdutor e a cor azul em direção oposta ao transdutor (CARVALHO, 2009).

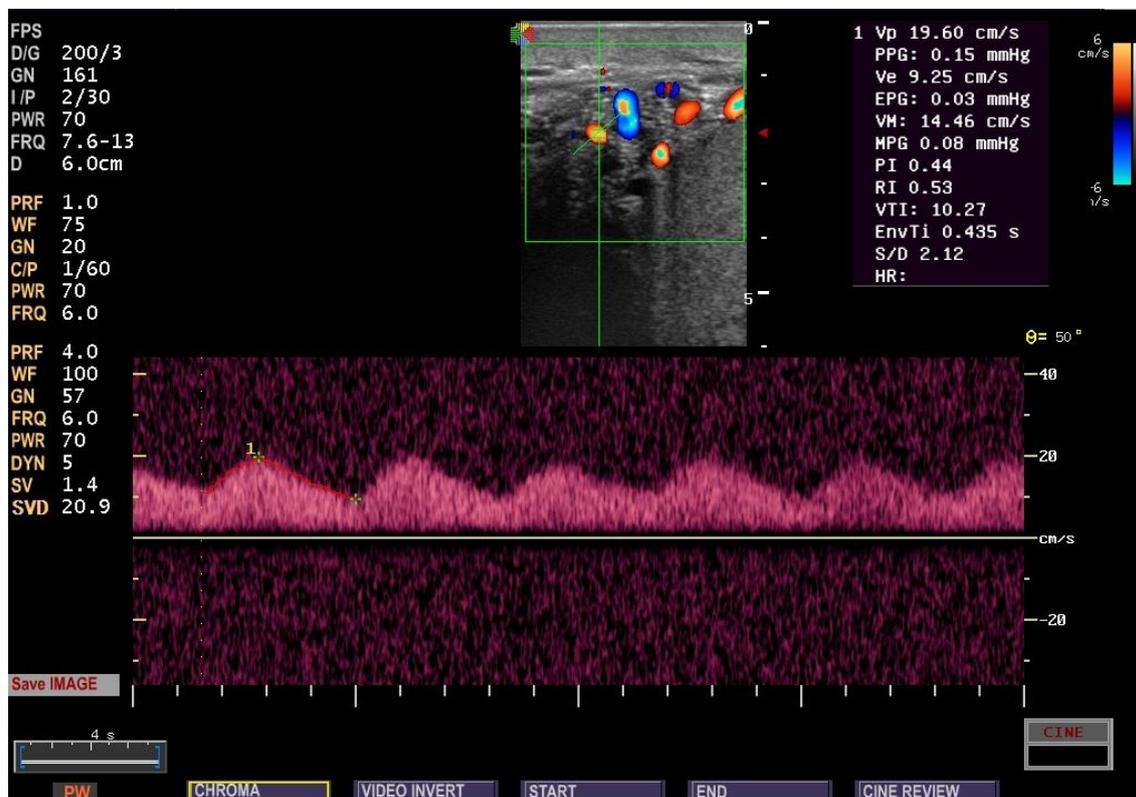
Além do modo colorido, dois outros modos são utilizados para avaliação desse exame ultrassonográfico: Power Doppler e Doppler espectral. O modo Power Doppler representa o estudo da amplitude do sinal Doppler; e o Doppler espectral, determina a velocidade do fluxo sanguíneo em função do tempo (DOGRA et al., 2003).

O Doppler espectral gera um gráfico com espectro temporal e os sinais também são representados de forma audível. Neste modo o som é transmitido em pulsos, permitindo um intervalo entre a transmissão do pulso e o retorno do eco. O sinal de desvio da frequência indica a direção do fluxo em relação ao transdutor. O gráfico dispõe de uma linha horizontal, que mostra o ponto zero de frequência, representando que não há movimento, ou ausência de eco (VAITKUS & COBBOLD, 1988). Por convenção, a imagem espectral acima da linha é definida como desvio positivo e aponta que o fluxo sanguíneo está em direção ao transdutor (Figura 3). Já quando o traçado está abaixo da linha, ele é considerado um desvio negativo, indicando que o fluxo está em direção contrária ao transdutor (CARVALHO et al., 2008a; CARVALHO, 2009).

O gráfico formado representa a dinâmica vascular, em que cada sequência representa um ciclo cardíaco completo (Figura 3). As análises desses ciclos permitem avaliar características hemodinâmicas de órgãos e tecidos, permitindo mensurar a velocidade média do fluxo sanguíneo, bem como índice

de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP) dos vasos correspondentes (SILVA, 2010).

Figura 3 – Ultrassonografia Color Doppler da artéria supratesticular



Fonte: Arquivo pessoal

2.8.1 Ultrassonografia testicular

A ultrassonografia testicular é um exame que permite avaliar o parênquima e suas estruturas adjacentes, permitindo detectar alterações anatômicas, podendo ser utilizado para fins de diagnóstico (MATTON & NYLAND, 2004). Além do seu uso na detecção de alterações clínicas, pode ser uma ferramenta para estimar o potencial produtivo destes animais, correlacionando a produção espermática e qualidade seminal (BAILEY et al., 1998).

O modo Doppler analisa a função e a perfusão vascular dos testículos (CARILLO et al., 2012), sendo uma ferramenta aplicada para avaliação da hemodinâmica da artéria testicular (GÜNZEL-APEL et al., 2001), avaliar possíveis enfermidades e, também, a produção espermática (ZELLI et al., 2013).

As ondas geradas pela artéria testicular se caracterizam por apresentar baixa resistividade e baixa pulsatilidade, indicando fluxos com picos sistólicos amplos e contínuos com alta velocidade de fluxo na diástole, evidenciando a demanda contínua de sangue para o seu metabolismo (CARVALHO et al., 2009).

Portugal (2014) encontrou diferença nos parâmetros velocimétricos entre dois grupos de touros, sendo um grupo de touros de qualidade espermática superior e outro grupo de qualidade inferior. O grupo de qualidade superior apresentou menores IR e IP, indicando que existe maior perfusão vascular do tecido (GINTHER & UTT, 2004), podendo denotar maior metabolismo do órgão avaliado (CARVALHO et al., 2008).

O uso do Doppler no presente trabalho tem como objetivo avaliar a existência de alterações nos parâmetros da hemodinâmica da artéria supratesticular de touros submetidos à suplementação de vitaminas e minerais, tendo em vista que não existem trabalhos na literatura que demonstram o monitoramento dos parâmetros Doppler e seus efeitos em animais suplementados.

3 - HIPÓTESE

Touros púberes submetidos à suplementação injetável de vitaminas e minerais apresentam melhora nos parâmetros de qualidade e produção espermática, bem como variações na hemodinâmica da artéria supratesticular.

4 - OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação parenteral de vitaminas e mineiras na produção, na qualidade espermática e na hemodinâmica da artéria supratesticular de touros púberes.

4.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar os efeitos da suplementação na cinética, concentração e morfologia espermática, realizados a cada 60 dias; e

2) Avaliar os efeitos da suplementação na hemodinâmica da artéria supratesticular, através da velocidade média e índices de pulsatilidade e resistividade a cada 60 dias.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.2 Local, Animais e Manejo

O experimento foi realizado em parceria com uma fazenda comercial localizada no município de Londrina, região Norte do Paraná (Latitude 23° .36'06" Sul, Longitude 51°05'43" Oeste), que apresenta clima subtropical úmido, com temperaturas variando entre 13°C e 30°C. A coleta dos dados de campo foi realizada de abril de 2022 a julho de 2022.

Foram utilizados tourinhos da raça Brangus (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), com idade inicial de 15 meses, escore de condição corporal (ECC) médio de 3.5 (Lowman et al., 1976), apresentando peso médio de 339kg ± 38,6 e considerados clinicamente saudáveis, avaliados através de inspeção visual (ECC) e anamnese. Durante todo o período do estudo, os animais foram mantidos na própria fazenda e receberam as práticas de manejo sanitário e nutricional recomendadas do próprio local. Os animais foram mantidos numa área de pastagem composta por *Brachiaria brizantha* cv *marandu*, além de receberem 0,8 a 1 kg de concentrado energético por animal. Água e sal mineral eram mantidas *ad libitum*.

5.2 Tratamentos e Delineamento

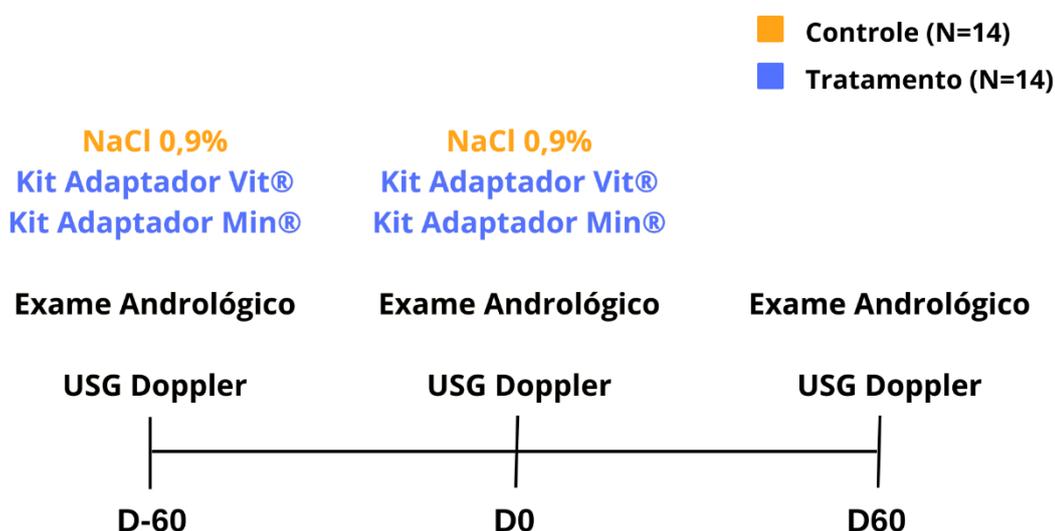
O experimento teve duração de 120 dias, sendo que ao início do estudo (D-60) 28 tourinhos hígidos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com 14 animais/cada, sendo um grupo Controle e um grupo Tratamento (Figura 4).

Nos tourinhos do grupo Tratamento foi utilizado a suplementação parenteral com vitaminas e minerais. Para suplementação vitamínica foi aplicado, por via subcutânea, 1mL / 50 kg de peso vivo do Kit Adaptador Vit® (Biogénesis Bagó, Curitiba, Brasil) composto por vitamina A palmitato (5.950.000 UI) e vitamina E acetato (5.000 UI) em 100 mL de excipientes. Para suplementação mineral foi aplicado por via subcutânea 1mL / 75 kg de peso vivo do Kit Adaptador Min® (Biogénesis Bagó, Curitiba, Brasil) composto por cobre (1,0 g), zinco (4,0 g), manganês (1,0 g) e selênio (0,5 g) em 100 mL de excipientes.

Já no grupo Controle os animais receberam aplicação de NaCl 0,9% no mesmo volume correspondente do grupo Tratamento.

A suplementação parenteral e aplicação de solução fisiológica repetiram-se 60 dias após a primeira avaliação, permanecendo os mesmos grupos e ajustadas as doses conforme o peso atual do animal.

Figura 4 – Delineamento experimental para avaliar o efeito da suplementação parenteral com complexo de vitaminas e minerais sobre os parâmetros espermáticos de tourinhos Brangus.



5.3 Exame Andrológico

Previamente ao início do estudo (D-60) os animais foram submetidos à avaliações andrológicas, sendo realizadas avaliações clínicas gerais através da inspeção e anamnese e, exames específicos do sistema reprodutor. O exame andrológico foi realizado em três ocasiões, sendo uma avaliação antes de iniciar o tratamento (D-60), uma segunda avaliação no dia 0 (segunda aplicação do tratamento) e uma terceira avaliação após 60 dias da segunda aplicação (D60).

O exame andrológico foi realizado conforme o Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal de 2013.

Nos três dias de avaliações, todos os animais foram pesados em balança eletrônica (Tru-Test S3, HD5T, Porto Alegre, Rio Grande do Sul) e tiveram os testículos avaliados quanto à sua consistência, mobilidade e simetria, segundo diretrizes do CBRA (2013). As mensurações testiculares foram obtidas pela circunferência escrotal e medidas lineares dos testículos. Para circunferência escrotal empregou-se uma fita métrica específica para esta finalidade e para medidas lineares utilizou-se um paquímetro para avaliar cada testículo (esquerdo e direito) quanto as medidas de profundidade (crânio-caudal), largura (latero-medial) e comprimento (dorso-ventral). Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo técnico.

5.4 Colheita de Sêmen

Os animais foram manejados em um tronco de contenção específico para a espécie bovina, e tiveram inicialmente as fezes evacuadas do reto por mão enluvada para melhor condução dos estímulos do eletroejaculador. Os pelos prepuciais foram aparados e o pênis e prepúcio lavados com água e secados com papel toalha, com o objetivo de diminuir a contaminação das amostras. A colheita foi realizada por um técnico experiente com o auxílio de um aparelho de eletroejaculação automático (Neovet®, Uberaba, Brasil). Os estímulos foram realizados na programação automática do aparelho com configuração específica para a subespécie *Bos taurus*, de intensidade gradativa e rítmica.

O sêmen foi coletado por um técnico responsável pelas análises do espermograma, sendo os primeiros jatos de sêmen desprezados e o restante coletados, utilizando-se funil acoplado a um tubo Falcon de 15 mL, previamente aquecido a 37°C, protegidos da luz solar. Após a coleta, os ejaculados foram encaminhados para o laboratório anexo ao curral, e mantidos em banho maria na temperatura de 37°C. No laboratório foram realizadas as avaliações macroscópicas do ejaculado, bem como da cinética espermática (turbilhão, motilidade e vigor).

5.5 Espermograma

Após a coleta, as análises foram realizadas por um técnico experiente durante todo experimento, sendo o ejaculado classificado a olho nu de acordo

com a sua coloração (esbranquiçada, branca e amarela), odor (*suis generis*), consistência (aquosa, opalescente, leitosa e cremosa) e volume (mL).

Para a avaliação do turbilhonamento, foi utilizado uma gota de 20µL de sêmen fresco depositada em uma lâmina pré-aquecida a 37°C e avaliadas por meio de um microscópio óptico (Nikon®) utilizando objetivas de 4X. A classificação do turbilhonamento é dimensionada pela movimentação em massa dos espermatozoides, identificadas através de ondas. Sendo classificados de zero, indicando ausência de movimento, até cinco, quando há movimentação intensa.

Para avaliação da motilidade e vigor espermático, outra lâmina aquecida a 37°C foi preparada, utilizando uma gota de 20 µL de sêmen fresco e coberta por uma lamínula, em seguida foi realizada a leitura em microscópio óptico nas objetivas de 10X e 40X. A motilidade espermática foi determinada de forma subjetiva, avaliando a proporção estimada de espermatozoides móveis (classificado de 0 a 100%) e o vigor através do movimento retilíneo e progressivo (classificado de 0 a 5) que foram mensurados após avaliação de pelo menos 5 (cinco) campos de visão da lâmina, conforme recomendações do CBRA (2013). O vigor nível 5 é a classificação direcionada as células com intensa movimentação e de direcionamento retilíneo, já a classificação nível 1 está relacionada às células de movimentação lenta e com predominância de movimentos irregulares, circulatórios e/ou retrógrados.

Para realizar a análise da concentração espermática, alíquotas de sêmen diluído foram armazenadas na proporção de 1:100, sendo 10 µL de sêmen e 990 µL de solução formol salina 6%. Posteriormente, uma gota de 10 µL da diluição foi adicionada a cada lado da Câmara de Neubauer, e a contagem de células realizadas com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon®), utilizando objetiva de 40X, sendo realizado a contagem de 5 quadrantes em cada lado da câmara. O valor da concentração foi definido conforme fórmula do CBRA.

Uma alíquota na proporção de 1:2 de sêmen (200 µL de sêmen e 400 µL de formol salina 6%) foi armazenada em tubo tipo Eppendorf para avaliação de morfologia espermática. Foram preparadas lâminas coradas utilizando método de coloração Cerovsky (Vermelho congo e Violenta Genciana). Em sequência a

leitura das lâminas foi realizada utilizando um microscópio óptico (Nikon®), utilizando óleo de imersão e objetiva de 100X. Para a classificação dos defeitos maiores e menores, foi realizada a contagem de 100 células, conforme método descrito por Bloom (1973) e CBRA (2013).

5.6 Ultrassonografia

A imagem ultrassonográfica foi realizada por um técnico experiente através de um ultrassom portátil com um transdutor linear de 7,5 MHz (Sonoscape S8®, Valinhos, São Paulo). O transdutor foi posicionado junto ao parênquima testicular de forma perpendicular à artéria suprategicular, estrutura identificada previamente através do modo B e em seguida avaliada através do modo Doppler colorido para realizar o mapeamento do leito vascular, em seguida, o modo Pulsed-Wave (PW) foi ativado, sendo observado pelo menos quatro ciclos cardíacos de desvio positivo para avaliação (BARCA JUNIOR et al., 2020). As medições ocorreram no maior vaso arterial identificado próximo do plexo pampiniforme, sendo que em todas as medidas, o ângulo de insonação Doppler nunca foram superiores a 60°, tendo como objetivo evitar a subestimação do pico sistólico (MERRITT, 1999; STEWART, 2001; CARVALHO, 2009).

Em cada testículo (esquerdo e direito), o ciclo cardíaco foi mensurado de forma manual, utilizando-se do software do próprio aparelho, que emitia de forma automática os dados de Velocidade Média (VM), Índice de Pulsatilidade (IP) e Índice de Resistividade (IR). O IP é calculado através da velocidade do pico sistólico menos a velocidade diastólica final, dividido pela velocidade média ($IP = \frac{VPS - VDF}{VM}$). Já o IR é calculado através da velocidade do pico sistólico menos a velocidade diastólica final, dividido pela velocidade do pico sistólico ($IR = \frac{VPS - VDF}{VPS}$).

5.7 Análise Estatística

Para cada análise estatística foram considerados somente dados dos tourinhos púberes. A puberdade foi considerada para um ejaculado com mínimo 50 milhões de espermatozoides e 10% de motilidade (WOLF et al., 1965).

Os dados foram previamente analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste F. Para cada variável estudada (tanto do espermograma como do ultrassom Doppler), o efeito de tratamento foi analisado por ANOVA empregando modelo linear generalizado (GLM). O modelo considerou o efeito fixo principal (tratamento vs. controle) e as covariáveis peso, ECC e circunferência escrotal. Para comparações ao longo do período experimental também empregou GLM, mas com medidas repetidas em que o momento de avaliação (D-60, D0 e D60) e os animais foram inseridos como fatores aleatório no modelo. Na presença de efeito significativo empregou-se o teste de Tukey como teste de média post-hoc. Para ocorrência de puberdade os grupos foram comparados pelo teste exato de Fisher. Para análise descritiva, os dados quantitativos estão apresentados como média (M) e erro padrão (SE) e os dados qualitativos como porcentagem (%). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1. Adotou-se um nível de significância de 5% para indicar um efeito das variáveis categóricas e suas interações.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao início do experimento (D-60) 15 animais já se encontravam na puberdade, sendo 50% (7/14) animais do grupo Controle e 57% do grupo Tratamento (8/14). Sessenta dias após a aplicação das primeiras dosagens de suplementação, 64,3% (8/14) dos animais do grupo Tratamento e 57,1% (9/14) dos animais do grupo Controle possuíam os parâmetros mínimos para serem considerados púberes (10% de motilidade e concentração espermática $\geq 50 \times 10^6$ spz/mL), entretanto não foi demonstrado diferença estatística quanto a ocorrência de puberdade entre os dois grupos ($P = 0.69$, Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de puberdade em tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de mineral e vitaminas a cada rodada de avaliação do estudo.

Grupo	D-60 % (n/N)	D0 % (n/N)	D60 % (n/N)
Controle	50.0 (7/14)	57.1 (8/14)	92.8 (13/14)
Tratamento	57.1 (8/14)	64.3 (9/14)	85.7 (12/14)
Valor de P	0.70	0.69	0.54

No terceiro e último dia de avaliação (D60), 85,7% (12/14) dos tourinhos que receberam tratamento e 92,8% (13/14) do grupo controle encontravam-se púberes, evidenciando que não houve diferença na indução de puberdade entre os dois grupos no período de 120 dias ($P = 0,54$). Corroborando com os resultados da pesquisa, Geary et al. (2021) também não evidenciaram indução de puberdade ao utilizar suplementos minerais de Zinco e Cobre por 84 dias em touros pré-púberes. Os resultados podem estar associados às boas condições dos animais que participaram do experimento, tendo em vista que não apresentavam carência nutricional.

O grupo Controle e Tratamento eram semelhantes ao início do estudo conforme o volume ($P = 0,07$), o turbilhão ($P = 0,74$), motilidade ($P = 0,56$) e vigor ($P = 0,87$). Este contexto reforça que os grupos eram homogêneos e equilibrados com relação a cinética espermática, o que fortalece o planejamento experimental sem favorecimento para nenhum dos grupos.

Após 60 dias da primeira aplicação (D0) e ao final do período experimental (D60), não houve efeito da suplementação sobre o volume do ejaculado ($P = 0,19$ e $P = 0,18$; respectivamente), bem como não foram identificadas alterações nos parâmetros de turbilhonamento ($P = 0,64$ e $P = 0,42$), motilidade ($P = 0,74$ e $P = 0,46$) e vigor ($P = 0,73$ e $P = 0,42$) para avaliações do D0 e D60, respectivamente (Tabela 2). Geary et al., (2021) também não encontraram diferenças significativas dos parâmetros supracitados entre os dois grupos de tratamento e o grupo controle ao comparar o uso de suplementos minerais sulfatados e não sulfatados de Manganês, Cobre e Zinco na alimentação dos touros durante 71 dias.

Tanto o volume de ejaculado quanto os dados de cinética espermática permaneceram estáveis ao longo do período experimental, ou seja, não houve variações ($P > 0,1$) em função do tempo acompanhado ou do tratamento testado.

A concentração espermática também não foi influenciada pelo Tratamento, não apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo Controle ($P = 0,98$, Tabela 3). Entretanto, dentro do grupo Tratamento houve diferença entre o primeiro dia de coleta e o último dia de avaliação ($P = 0,03$). Essa melhora nos valores de concentração espermática dos animais do grupo Tratamento pode estar associada a suplementação, porém mais estudos devem ser realizados, logo que não houve diferença quando comparado ao grupo controle. Kumar et al. (2006) ao suplementarem touros cruzados por 6 meses, identificou melhora quantitativa e qualitativa dos espermatozoides dos animais suplementados com Zn em relação ao grupo controle, sugerindo que o tempo de suplementação pode influenciar na melhora dos parâmetros do espermograma.

A morfologia espermática não sofreu interferência da suplementação entre os grupos experimentais, nos três períodos avaliados, tanto para os defeitos maiores, quanto para os defeitos menores.

Tabela 2 – Volume e cinética espermática de tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de vitaminas e minerais a cada rodada de avaliação do estudo.

Variáveis	Grupo	N	D-60 (M±EP)	N	D-0 (M±EP)	N	D60 (M±EP)	Valor de P
Volume	Controle	7	4.8 ± 0.4	8	3.7 ± 0.6	13	4.6 ± 0.6	0.51
	Tratamento	8	6.1 ± 0.5	9	4.8 ± 0.3	12	5.6 ± 0.7	0.21
	Valor de p		0.07		0.19		0.18	
Turbilhão	Controle	7	1.7 ± 0.5	8	2.0 ± 0.6	13	2.1 ± 0.4	0.76
	Tratamento	8	1.7 ± 0.4	9	1.8 ± 0.5	12	2.5 ± 0.3	0.40
	Valor de p		0.74		0.62		0.42	
Motilidade	Controle	7	60.7 ± 8.5	8	59.4 ± 12.9	13	57.7 ± 9.6	0.97
	Tratamento	8	68.1 ± 7.8	9	55.0 ± 9.9	12	67.9 ± 8.2	0.27
	Valor de p		0.56		0.74		0.46	
Vigor	Controle	7	2.8 ± 0.1	8	3.4 ± 0.4	13	2.5 ± 0.4	0.41
	Tratamento	8	2.7 ± 0.3	9	3.2 ± 0.2	12	2.8 ± 0.4	0.71
	Valor de p		0.87		0.73		0.42	

Médias ± Erro Padrão (M±EP) das variáveis Turbilhão, Motilidade e Vigor do grupo Controle e Tratamento em função dos dias avaliados

Tabela 3 – Concentração e morfologia espermática de tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de vitaminas e minerais a cada rodada de avaliação do estudo.

Variáveis	Grupo	N	D-60 (M±EP)	N	D-0 (M±EP)	N	D60 (M±EP)	Valor de P
Concentração de sptz/mL	Controle	7	52.6 ± 25.6	8	129.6 ± 58.6	13	237.5 ± 80.5	0.15
	Tratamento	8	49.4 ± 12.4 B	9	104.2 ± 44.2 AB	12	236.3 ± 89.8 A	0.03
	Valor de p		0.30		0.92		0.98	
% Def. maiores	Controle	7	50.3 ± 8.9	8	24.1 ± 8.3	13	18.5 ± 3.9	0.16
	Tratamento	8	32.7 ± 9.6	9	12.1 ± 5.3	12	20.8 ± 5.7	0.59
	Valor de p		0.60		0.78		0.71	
% Def. menores	Controle	7	3.4 ± 0.5	8	8.0 ± 2.1	13	10.4 ± 3.0	0.32
	Tratamento	8	13.1 ± 3.3	9	8.7 ± 2.6	12	9.9 ± 2.4	0.76
	Valor de p		0.04		0.55		0.92	

Médias ± Erro Padrão (M±EP) das variáveis Concentração de espermatozoides por mL (sptz/ml) Defeitos maiores e Defeitos menores do grupo Controle e Tratamento em função dos dias avaliados.

A-B Letras maiúsculas sobrescrita indicam diferenças estatística (p<0,05) entre os momentos de avaliação

Também não foi observado variações significativas ($P > 0,1$) dos defeitos espermáticos dentro de cada grupo ao longo do período experimental (Tabela 3).

Os resultados supracitados em relação a morfologia espermática corroboram com Chacur et al. (2010), que não identificaram benefícios após suplementar os animais com nutracêutico comercial, contendo vitaminas, aminoácidos e minerais durante 70 dias.

Tsuneda et al. (2019) suplementaram touros Brangus com Selênio por 60 dias, e não foi observada interferência da suplementação nos valores de vigor espermático, integridade e funcionalidade de membrana plasmática bem como na integridade da membrana acrossomal e reação acrossomal de amostras de sêmen fresco e congelado. Porém, foi observada queda de motilidade comparada ao grupo controle, e após o fim da suplementação de selênio, o percentual de espermatozoides móveis voltou a aumentar. Os resultados de Tsuneda et al. (2019) demonstram que o excesso de suplementação de selênio pode interferir de forma negativa na cinética espermática.

Marinho (2016) não identificou melhora na qualidade espermática após suplementação de tocoferol, assim como no presente trabalho. Porém, os resultados divergem de Velásquez-Pereira et al. (1998) que compararam os efeitos da suplementação em animais que foram submetidos à alimentação com gossipol, evidenciando o potencial antioxidante da vitamina em relação ao fator estressante. Achados de efeitos protetores também foram evidenciados por Hatamoto et al (2006) em cães, após mimetizar efeitos estressantes utilizando dexametasona.

Não foram encontradas diferenças ($P > 0,1$) nos parâmetros de avaliação da ultrassonografia Doppler (VM, IP e IR) entre o grupo controle e tratamento nem ao início (D-60), durante (D0) ou ao final do estudo (D60). Tanto a VM, como o IR e o IP também não se alteraram ($P > 0,1$) conforme o período de avaliação dos touros, permanecendo com valores constantes independentemente do grupo monitorado (Tabela 4).

Os Índices Doppler foram considerados confiáveis na identificação de distúrbios reprodutivos (PINGGERA et al., 2008), além de serem bons marcadores da espermatogênese (BIAGIOTTI et al., 2002). O aumento do IR e IP indicam alterações da perfusão sanguínea (SCHURICH et al., 2009). Os

valores de IR e IP aumentado foram relatados em cães com afecções como orquite, criptorquidismo, epididimite e tumores testiculares (BUMIN et al., 2007).

Os parâmetros de avaliação em bovinos ainda são escassos na literatura, entretanto, baseando-se na literatura de pesquisas em humanos, o IR da artéria testicular maior que 0,6 sugere maior ocorrência de espermatozoides patológicos ao exame andrológico (PINGGERA et al., 2008). No presente trabalho o IR variou de 0,49 a 0,56, indicando que os valores se enquadram na normalidade.

Para efeito de comparação, Barca Junior et al. (2020) realizaram ultrassonografia testicular de touros de diferentes raças (Aberdeen Angus, Braford, Brangus, Hereford e Nelore), para determinar os parâmetros hemodinâmicos do fluxo sanguíneo testicular. Todos os animais eram criados no manejo extensivo e recebiam suplementação mineral e água *ad libitum*.

Os valores de VM, IR variaram entre as raças, sendo que a maior VM foi observada nos animais da raça Brangus (16.28 ± 1.02), valor que vai ao encontro dos resultados do presente trabalho, entretanto os valores de IR e IP divergiram, apresentando média e erro padrão de 0.30 ± 0.02 e 0.36 ± 0.02 respectivamente.

Rodrigues (2018) identificou valores de IR da artéria testicular de bovinos da raça Caracu e Nelore, que variaram de 0,39 a 0,51. Os menores valores foram evidenciados nos touros Caracu quando comparado ao Nelore, que foi justificado pelo autor como uma necessidade decorrente da maior perfusão sanguínea em relação ao tamanho testicular dos animais da raça taurina, tendo em vista o desenvolvimento mais precoce desses animais.

Já Galdioli (2020) avaliou a hemodinâmica da artéria suprategicular em touros da raça Braford durante 12 meses, buscando identificar os efeitos do clima nos mecanismos de termorregulação testicular. A média do IR variou de 0,36 a 0,54. O menor IR foi associado aos meses de maior temperatura ambiental, resultado relacionado ao aumento do fluxo sanguíneo testicular.

Logo, deve se levar em consideração os efeitos do clima na hemodinâmica da artéria suprategicular no presente trabalho.

Tabela 4 – Velocidade média, Índice de Pulsatilidade e Índice de Resistividade da artéria suprategicular de tourinhos Brangus tratados com suplementação parenteral de vitaminas e minerais a cada rodada de avaliação do estudo.

Variáveis	Grupo	N	D-60 (M±EP)	N	D-0 (M±EP)	N	D60 (M±EP)	Valor de P
Velocidade média (cm/s)	Controle	7	15.53 ± 1.33	8	16.40 ± 1.26	13	13.35 ± 0.62	0.51
	Tratamento	8	16.82 ± 0.86	9	15.89 ± 0.87	12	14.09 ± 0.68	0.21
	Valor de p		0.18		0.89		0.20	
IP	Controle	7	0.58 ± 0.09	8	0.55 ± 0.05	13	0.61 ± 0.06	0.76
	Tratamento	8	0.48 ± 0.06	9	0.49 ± 0.04	12	0.55 ± 0.05	0.40
	Valor de p		0.12		0.44		0.45	
IR	Controle	7	0.55 ± 0.06	8	0.54 ± 0.03	13	0.56 ± 0.03	0.97
	Tratamento	8	0.49 ± 0.04	9	0.54 ± 0.03	12	0.54 ± 0.03	0.27
	Valor de p		0.15		0.72		0.78	

Médias ± Erro Padrão (M±EP) das variáveis Velocidade Média, Índice de Pulsatilidade (PI) e Índice de Resistividade (RI) em função dos dias avaliados

7 - CONCLUSÃO

A suplementação parenteral de vitaminas e minerais não promoveu benefícios aos parâmetros de quantidade e qualidade espermática, bem como não ocasionou alterações na hemodinâmica da artéria suprategicular de tourinhos Brangus.

8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de vitaminas e minerais para a melhora da qualidade espermática de touros ainda é um desafio que necessita de mais estudos para identificar a padronização de seu uso no meio comercial, tendo em vista os dados da literatura e os resultados descritos no presente trabalho. O uso da ultrassonografia Doppler é um exame complementar que pode ser empregado na avaliação andrológica, auxiliando no diagnóstico clínico de enfermidades reprodutivas e também como uma ferramenta na compreensão das etapas da espermatogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula** - 5ª. ed. ArtMed. 2008.

ASBIA – Associação Brasileira de inseminação artificial. Index de comercialização de sêmen de 2021. <http://www.asbia.org.br/novo/index/pdf> Acesso em: 29/06/2022

AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology Of Male Reproduction. **USDA-ARS/UNL Faculty**, p. 765. 1983.

APPLING, D. R.; CHYTIL, F. Evidence of a role for retinoic acid (vitamin A-acid) in the maintenance of testosterone production in male rats. **Endocrinology**, v. 108, p. 2120-2124, 1981.

BAILEY T. L.; HUDSON R. S.; POWE T. A.; RIDDELL M. G, WOLFE D. F, CARSON R. L. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v. 49, p. 581-594, 1998.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em Bovinos**. 3. ed. Editora Roca. 2006.

BARCA JUNIOR, F. A.; KOETZ JUNIOR, C.; FÁVARO, P. DA C.; PEREIRA, G. R.; MENEGASSI, S. R. O.; MOROTTI, F.; GALDIOLI, H.G.; SOUZA, A. K.; BARCELLOS, J. O. J.; SENEDA, M. M. Infrared thermography and Doppler ultrasonography to evaluate the effects of scrotal insulation on testicular blood flow dynamics in bulls. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, p. 1267-1278, 2020.

BARCA JUNIOR, F. A.; KOETZ JUNIOR, C.; FÁVARO, P. DA C.; PEREIRA, G.; MOROTTI, F.; MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J.; SENEDA, M. M. Effect of breed on testicular blood flow dynamics in bulls. **Theriogenology**. V. 118, 2018.

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; FILHO, M.F.S.. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction** 9, 139–152, 2012.

BIAGIOTTI G.; CAVALLINI G.; MODENINI F.; VITALI G.; GIANAROLI L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. **BJU international**, 2002.

BLOMM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bulls spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v. 25, n. 7-8, p. 383-391, 1973.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1145-1155, 1999.

BUMIN A.; KAYA M.; KAYA Ü.; KIBAR M.; ALKAN Z. Gray-scale, colour and power Doppler sonography of scrotal disorders in dogs. **Rev. Med. Vet.**, v. 158, p. 128-133, 2007.

CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H.; PASTORE, A. A.; CANOLA, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; MERCADANTE, M. E. Z. Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 78-82, 2012.

CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia Doppler em pequenos animais**. São Paulo: Roca, p. 274, 2009.

CEZAR I. M.; QUEIROZ, H.; P, S. THIAGO L. R. L.; CASSALES, F. L. G.; COSTA, F. P. Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate. Campo Grande, MS. **Embrapa Gado de Corte**, 40, p. 2005.

CHACUR, M. G. M.; AURÉLIO, P. T. F.; OBA, E.; LAPOSY, C. B.; SCALON JUNIOR, O.; INAGUE, L.; KRONKA, S. N. 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.

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.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, p. 104, 2013.

DADOUNE, J. P. Morphogenesis, organization and abnormalities of the nucleus in human spermatozoa. **Pathology Biological**, v. 41, n. 3, p. 220-221, 1993.

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.

DODE, M. A. N.; SCHENK, J. A. P.; SILVA, A. E. D. F. Determinação da puberdade em machos Nelore e mestiços. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, n. 1, p. 185, 1989.

DOGRA, V. S.; GOTTLIEB, R. H.; OKA, M.; RUBENS, D. J. Sonography of the scrotum. **Radiology**, v. 227, n. 1, p. 18-36, 2003.

FAYRER-HOSKEN, R. Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 195-202. 1997.

FERNANDES, C.; OLIVEIRA, A.; MIRANDA, P.; LOPES, S.; MORAES, S.; MORAIS, M.; ABREU, U.; LANDIM, A. F. Alterações na morfologia espermática em touros de corte com e sem suplementação de zinco na mistura mineral. **Ciência Animal Brasileira**. v.10. 2009.

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

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

FRENEAU, G. E.; DIAS, F. M. G. N.; PUOLI, J.R. Avaliação de uma população de touros Nelore pelo índice de capacidade andrológica por pontos (CAP). In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia. v. 33, p. 344-347, 1996.

GARCIA J M.; PINHEIRO L. E. L.; OKUDA H. T. Body development and semenphysical and morphological characteristics of Young Guzerah bulls. **Ars. Vet.**, v. 3, p. 47-53, 1987.

GALDIOLI, V. H.G. Comportamento da hemodinâmica da artéria suprategesticular ao longo das quatro estações do ano em touros Braford. **Dissertação UNOPAR** Medicina Veterinária - Saúde e Produção de Ruminantes, 2020. Arapongas: UNOPAR, 2020.

GARNER D. L.; HAFEZ E. S. E. Espermatozóide e plasma seminal. In: Hafez. **Reprodução Animal**. 7º ed. Barueri: Manole Ltda, Cap. 7, p. 97-110, 2004.

GEARY T.; WATERMAN R.; VAN E. M.; RATZBURG C.; LAKE S.; EIK B.A.; ARMSTRONG D.; ZEZESKI A.; HELDT J. Effect of supplemental trace minerals on standard and novel measures of bull fertility. **Theriogenology**. v. 172, n. 15, p. 307-314, 2021.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Minerais e vitaminas no metabolismo animal**. Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, VII, p. 135, 2019.

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.; 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.** 2016.

GUAN, Y.; MALECKI, I. A.; HAWKEN, P. A.; LINDEN, M. D.; MARTIN, G. B. Undernutrition 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.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: **Clarendon Press**, p. 543, 1989.

HIDIROGLOU, M.; KNIPFEL, J. E. Zinc in mammalian sperm: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 6, p. 1147-1156, 1984.

HURLEY, W. L.; DOANE, R. M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 784-804, 1989.

KAJI, M. Zinc in endocrinology. **International Pediatrics**, v. 16, n. 3, 2001.

KAUSHAL, N.; BANSAL, M. O. Dietary selenium variation-induced oxidative stress modulates CDC2/cyclin B1 expression and apoptosis of germ cells in mice testis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 8, p. 553-564, 2007.

KEMPINAS; W.; KLINEFELTER, G. The Epididymis as a Target for Toxicants. **Comprehensive Toxicology**, 2014.

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

KVIST, U.; BJORNDHAL, L. Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin descondensation. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 124, p. 195-200, 1985.

LAM, W. W.; YAO, T.; JACOBSEN, A. S.; TEO, H. J. E. Colour Doppler ultrasonography replacing surgical exploration for acute scrotum: myth or reality. **Pediatric Radiology**, v. 35, n. 6, p. 597-600, 2005.

LEE, B.; PINE, M.; JOHNSON, L.; RETTORI, V.; HINEY, J. K.; DEES, W. L. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 580-585, 2006.

LIVERA, G.; ROUILLER-FABRE, V.; PAIRAULT, C. et al. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. **Reproduction**, v. 124. p. 173-180, 2002.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; WHITMOYER, R. M. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1544-1550, 2000.

MARINHO, W. A. S.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS L. K.; ZERVOUDAKIJ, T.; S ARGUELLO, F. A. P. de B.; TSUNEDA, B. H.; DUARTE JUNIOR, M. F.; TSUNEDA, P. P.; BARBOSA, E. A. Características seminais e de membrana espermática em touros suplementados com tocoferol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 17, n. 2, p. 322-330, 2016.

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.

MARTINS, S. M. M. K. et al. Avaliação da suplementação de vitamina A nas características seminais em reprodutores suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1518-1524, 2009.

MATTON J. S.; NYLAND T.G. Próstata e testículo. In: Nyland TG, Matton JS. **Ultrassom: diagnóstico em pequenos animais**. 4. ed. São Paulo: Rocca, p. 255-271, 2004.

MARTIN, L. C. T. **Nutrição mineral de bovinos de corte**. São Paulo: Nobel, p. 39-125, 1993.

MEDEIROS, R. M. T.; PAULINO, C. A. Vitaminas. SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 541-554, 1999.

MERRITT, C. R. B. Física do Ultra-som, in: RUMACK, C. M.; WILSON, S. R.; CHARBONEAU, J. W. **Tratado de ultra-sonografia diagnóstica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 3-29, 1998.

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

NICODEMO, M. L. F.; SERENO. J. R. B.; AMARAL, T. B. **Minerais na eficiência reprodutiva de bovinos**. 1ª ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

OLIVEIRA, A. R.; MORAES, S. S.; FERNANDES, C. E.; LOPES, S. C. P.; SOARES, C. O.; AMARAL, T. B.; MIRANDA, P. A. B. Efeito de diferentes níveis de zinco na dieta sobre a qualidade seminal e correlação com a concentração

de zinco circulante e no plasma seminal em touros. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**. Campo Grande, v. 41, 2004.

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.

PALLUDAN, B. Vitamin A deficiency and its effect on the sexual organs of the boar. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 4, p. 136-155, 1963.

PINGGERA G. M. et al. **Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler Ultrasonography Measurements as a Predictor of Spermatogenesis**. v. 101, p. 722-6, 2008.

PTASZYNSKA, M. **Compêndio de Reprodução Animal**. Intervet. p. 399, 2007.

QUINN, P. J. Deoxyribonuclease activity in semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 25-41, 1986.

RODRIGUES, N. N. Biometria e parâmetros ultrassonográficos de testículos, epidídimos e glândulas genitais acessórias em touros Nelore e Caracu em duas classes de idade. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

ROSA, A. DO N.; MARTINS. E. N.; MENEZES, G. R. DE O.; SILVA, L. O. C. Melhoramento genético aplicado em gado de corte. **Programa Genepplus-Embrapa** / Brasília, DF: Embrapa, p. 256, 2013.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. **Clearwater: Cache River Press**, p. 284, 1990.

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 Inc**, Unitaad States, NY, p. 381, 2012.

SETCHELL B. P.; VOLGMAYR J. K.; HINKS N. T. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. **J. Reprod. Fertil**, v. 24, p. 81-89, 1971.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam. **Embrapa** – CNPGC. Campo Grande, 1993.

SILVA, A. R.; FERRAUDO, A. S.; PERECIN, D.; LIMA, V. F. M. H. Efeito da idade do touro e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças europeias e zebuínas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, n. 7, 2009.

SILVA, L. D. M.; SOUZA, M. B.; BARBOSA, C. C.; PEREIRA, B. S.; MONTEIRO, C. L. B.; FREITAS, L. A. Ultrassonografia bidimensional e Doppler para avaliação do trato reprodutor de pequenos animais. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 339-353, 2012.

SMITH, O.; AKINBAMIJO, O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal reproduction science**. 2000.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos dos machos. **Fisiologia dos animais domésticos**, Cap. 35, Rio de Janeiro, p. 603-614, 1996.

STEINER, J.; NAZARI, E. M.; BRESSAN, C. M.; AMMAR, D; ZANELLA, L.; ROSA, R. D. Aprimoramento de recursos didáticos e de metodologias de ensino utilizadas nas disciplinas de Embriologia Animal. In: **4ª SEPEX**, Florianópolis, 2004.

STEWART, S. F. C. Effects of transducer, velocity, Doppler angle and instrument settings on the accuracy of color Doppler ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 551-564, 2001.

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, out. 1996.

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.

VAITKUS, P. J.; COBBOLD, R. S. A comparative study and assessment of Doppler ultrasound spectral estimation techniques part I: estimation methods. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 661-672, 1988

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; CHENOWETH, P.J.; MCDOWELL, L.R.; RISCO, C.A.; STAPLES, C.A.; PRICHARD, D.; MARTIN, F.G.; CALHOUN, M.C.; WILLIAMS, S.N.; WILKINSON, N.S. Reproductive effects of feeding gossypol and vitamin E to bulls. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2894-2904, 1998.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Pre-puberal behaviour and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v. 24, p. 761-765, 1965.

ZELLI, R.; TROISI, A.; ELAD, A.; CARDINALI, L.; POLISCA, A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of

spermatogenesis in the dog. **Research in veterinary science**. v. 95, p. 632-637, 2013.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 22/2022

Londrina, 01 de Abril de 2022.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: **“Avaliação espermática e ultrassonográfica de touros submetidos a suplementação injetável de vitaminas e minerais”** protocolo CEUA nº 007/2022 sob a responsabilidade de Fábio Morotti, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UJEL) no dia 01/04/2022.

Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos da suplementação parenteral de vitaminas e minerais e compreender os efeitos da hemodinâmica testicular na produção e qualidade espermática de touros pré- púberes. **Grau de invasividade: GI2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	21/04/2022 a 21/11/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Bovino
Nº de animais	40
Peso/ Idade	1 – 2 anos
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Brangus Brawir – Londrina/PR
Amostras a serem coletadas	Sangue e sêmen.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UJEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Profª Drª Patrícia Chimin Perandini
Coordenadora da CEUA/UJEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Fábio Morotti /CCA

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Clínicas Veterinárias /CCA

C/C para a Direção do Centro de Ciência Agrárias/CCA