UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAROLINA CAMARGO ROCHA

**Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de
touro *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento
sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos
poliinsaturados**

São Paulo

2013

CAROLINA CAMARGO ROCHA

Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos poliinsaturados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof^a Dr^a Valquiria Hippolito Barnabe

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2769
FMVZ

Rocha, Carolina Camargo

Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos poli-insaturados / Carolina Camargo Rocha. -- 2013.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquiria Hippolito Barnabe.

1. Estresse térmico. 2. Touros. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Ácidos graxos poli-insaturados. 5. Vitamina E. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Carolina Camargo Rocha

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto intitulado: "Efeito do tratamento antioxidante sistêmico e em amostras espermáticas de touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados", protocolado sob o número 1681/2009, utilizando 16 (dezesesseis) touros, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

The "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo has analyzed the research entitled: "Effect of systemic and sperm samples treatment with antioxidants from bulls *Bos taurus taurus* under heat stress and supplemented with diet rich in poly-unsaturated fatty acids", protocol number 1681/2009, under the responsibility Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe, and found that it was conducted in accordance with the principles of ethics adopted by the committee.

São Paulo, 9 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROCHA, Carolina Camargo

Título: **Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos poliinsaturados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

DATA___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades que a vida me trouxe e trará com a finalização de mais uma etapa importante.

Aos meus pais, Vera e Aloisio pela criação, incentivo, amor e sacrifícios. Sem eles eu não teria conseguido realizar meus sonhos. Agradeço por serem essas pessoas maravilhosas e por tudo que já fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu irmão Rodolfo, pela amizade, brigas, risadas, por fazer parte da família.

À minha família em especial minha prima Cintia sempre do meu lado mais do que uma prima, uma super amiga. Meus primos e primas, tias e tios sempre presentes na minha vida me ajudando e apoiando. Amo demais todos.

Ao Guilherme, sempre me incentivando, apoiando e acreditando em mim. Te Amo.

À Profa. Valquiria minha orientadora, pelos incentivos, apoios e ensinamentos pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Renato grande pessoa e professor sempre educado e gentil.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Reprodução Animal FMVZ-USP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À CAPES/CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Departamento Anatomia Animal FMVZ-USP, por colocar à disposição o laboratório e pela ajuda com análise histológica do meu projeto, em especial André, Diogo, Prof. Assis Neto, Maria Amélia.

Ao Departamento de Patologia Animal FMVZ-USP, em especial agradeço ao Luciano e Claudio pelo auxílio na obtenção das minhas lâminas.

Ao Marcílio um amigo repleto de competência, sugestões, discussões, busca de resultados, ensinamentos e empenho no intuito de chegar à excelência. Grande amigo sempre com jantares maravilhosos,

A Wine, uma cachorra encantadora, manhosa e sempre me recepcionando com muita alegria.

A Fazenda Paineiras, em especial ao Sr. Irineu, Sra.Celia e Dona Sônia pela oportunidade e ter colocado a disposição a propriedade da Família Gualtieri para a realização do meu projeto, esses Senhores sempre se preocupando com o bem estar da equipe que ficou alojada na propriedade durante quatro meses do experimento.

Aos funcionários da Fazenda Paineiras, Alemão, Leninha, Nando e todos que nos deram grande ajuda, sem eles esse experimento não teria acontecido.

Aos meus amigos de graduação e pós graduação serão sempre eternos na minha vida sem eles etapas da minha vida não teria sentido, são eles: Andressa (Dê), Bruna, Diego (Diegoviski), Eduardo (Edu), Geissiane (Gê), Marcilio (Japa), Maria Augusta (Gutinha), Mariana Rodrigues (Mari), Roberta (Robs), João Rafael (Jones), Paola.

Aos meus amigos Pirassununguenses, agradeço de te-lós como amigos, foram muitas risadas, churrasco, danças, trabalho e sempre mantendo o bom humor: Patricia (Paty), Aline Kherle, José Rodrigo, Milton (Mirto), André, Simone, Thiago (Arroz), Kleber, Moana, Gi, Lindsay e os demais.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal

A Profa. Dra. Eneiva Carla, Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral, Profa. Dra. Cláudia e Marcílio por aceitarem participar da Banca de Defesa desta Tese, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos colegas do VRA do que fiz durante a pós-graduação.

Ao Miguel, pela paciência, exemplo de organização e bate-papos.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal pela ajuda sempre bem vindas.

A Dona Silvia que já nos deixou e foi uma pessoa muito carismática, educada, uma guerreira, que nos mostrou uma mulher com muita determinação.

Às secretárias Harumi, Thais e Roberta pela sua força, entusiasmo e otimismo contagiantes na administração do departamento e compromissos dos pós graduandos, sendo profissionais extremamente competentes e dedicadas.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Aos animais que participaram desta pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria completa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Tese de Mestrado.

RESUMO

ROCHA, C. C. **Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos poliinsaturados.** [Testicular ultrasound, morphometry and hystology of *Bos taurus taurus* bulls submitted to testicular warming, systemic antioxidant treatment and polyunsaturated fatty acids supplementation]. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Vários estudos indicam uma maior susceptibilidade ao estresse térmico de touros europeus quando criados em regiões tropicais, levando a efeitos deletérios à reprodução (e.g., diminuição da qualidade espermática, degeneração testicular). Tal fato pode causar expressivo prejuízo econômico visto que, nestas regiões, a estação de monta é realizada no verão. Um dos principais mecanismos propostos para explicar este efeito seria um aumento do estresse oxidativo. Assim, uma alternativa promissora seria o tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados. O presente estudo tem como objetivo: Avaliar os possíveis efeitos benéficos da suplementação oral com ácidos graxos poli-insaturados (com vs. sem) e a ação protetora do tratamento sistêmico com vitamina E (com vs. sem) contra os danos oxidativos causados pelo estresse térmico testicular em touros taurinos insulados através das avaliações ultrassonográfica, morfométrica testicular (i.e, volume, temperatura, consistência, circunferência) e histológica dos testículos. Para isso, foram utilizados 16 touros *Bos taurus taurus* jovens (em torno de 2 anos de idade) divididos em 4 grupos (fatorial 2x2) com perfil espermático normal. Todos os animais foram submetidos à insulação testicular por um período de 96 horas. Foi realizada a ultrassonografia testicular a cada 13 dias por todo o período e mais dois meses após o período da insulação. Como controles foram avaliados os testículos dos touros antes da insulação. Concomitante à insulação, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 lotes que foram submetidos a um arranjo fatorial 2x2, sendo um dos fatores a dieta rica em PUFA (Ácidos graxos poli-insaturados – Megalac E®) todo o dia durante dois meses pós insulação. Já o tratamento sistêmico com Vitamina E (Monovin E®) foi realizado através da injeção subcutânea de 5 ml de α -tocoferol a cada 13 dias pós insulação com duração de dois meses pós insulação.

Aos animais que não receberam a vitamina E, foi administrado o mesmo volume em placebo (óleo inerte). No final deste período, os animais foram castrados e os testículos utilizados para a histologia. Os resultados foram analisados através do SAS system for Windows e indicaram que tanto a suplementação oral de ácidos graxo poli-insaturados como o tratamento sistêmico com vitamina E, não alteraram as características ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros de origem europeia submetidos a insulação testicular.

Palavras-chave: Estresse térmico. Touros. Espécies reativas de oxigênio. Ácidos graxos poli-insaturados. Vitamina E.

ABSTRACT

ROCHA, C. C. **Testicular ultrasound, morphometry and hystology of *Bos taurus taurus* bulls submitted to testicular warming, systemic antioxidant treatment and polyunsaturated fatty acids supplementation.** [Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos poli-insaturados]. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Several studies indicate an increased susceptibility to the heat stress in European bulls raised under tropical conditions, which leads to deleterious effects on reproduction (e.g., testicular degeneration, impaired sperm quality). This may cause significant economic losses since, in these regions, breeding season usually occurs during summer. The main mechanism proposed to explain such event is the oxidative stress. Therefore, an alternative to overcome this effect would be the treatment with antioxidant combined with a supplementation with poly-unsaturated fatty acids (PUFA). The present study aimed to evaluate the possible beneficial effect of the oral PUFA supplementation combined with a protective antioxidant treatment to overcome the deleterious effects of the heat stress on testicular echogenicity, morphometry (i.e., volume, circumference, consistency) and histology. Towards this aim, 16 young but sexually mature *Bos taurus taurus* (around 2 years old). All animals were submitted to testicular warming for 96 hours. Simultaneously to the insulation, animals were randomly allocated into 4 groups in a 2x2 factorial design. One of the factors was a PUFA supplementation (supplemented vs. non-supplemented; Megalac E®) everyday for two months. The other factor was a systemic treatment with a subcutaneous administration of 5 mL of α -tocopherol (treated vs. non treated) every 13 days for two months. Animal that did not receive the treatment were injected with 5 mL of inert oil. Testicular ultrasound evaluation was performed each 13 days from the beginning until two months after testicular warming. At the end of the period experimental period, animals were castrated and the testicles were submitted to histological evaluation. Data were statistically analyzed using the SAS system for Windows. Results indicated that oral PUFA

supplementation combined with the systemic α -tocopherol treatment had no influence on testicular echogenicity, morphometry and hystology in European bulls submitted to testicular warming.

Keywords: Heat stress. Bulls. Reactive oxygen species. Polyunsaturated fatty acids. Vitamin E.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT catalase

CE circunferência escrotal

CTD comprimento do testículo direito

CTE comprimento do testículo esquerdo

CSTD consistência testicular direita

CSTE consistência testicular esquerda

DHA ácido docosaexanoico

DNA ácido desoxiribonucleico

EROS espécies reativas de oxigênio

ETC estresse térmico calórico

FMVZ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GSH glutathione

GR glutathione redutase

GPx glutathione peroxidase

H₂O₂ peróxido de hidrogênio

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL incisão lateral

IM intramuscular

LTD largura do testículo direito

LTE largura do testículo esquerdo

MHz mega hertz

O² molécula de oxigênio

O₂ - ânion superóxido

OH⁻ radical hidroxila

PUFA/PUFAs ácidos graxos poliinsaturados

Prx peroxirredoxinas

SAS Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)

SID dose única

SOD superóxido dismutase

TD testículo direito

TE testículo esquerdo

USP Universidade de São Paulo

vs. Versus

VIT E vitamina E

LISTA DE SÍMBOLOS

α alfa

cm centímetro

% porcentagem

= igual

° graus

°C graus Celsius

i.e. isto é

Kg quilograma

> maior que

± mais ou menos

< menor que

® marca registrada

MS matéria seca

mg miligrama

mL mililitro

mm milímetro

p nível de significância

TA temperatura do ar

UR umidade relativa do ar

X versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Lote de touros utilizados no experimento.....	53
Figura 2 -	Dados de temperatura mínima e máxima (em graus Celsius), precipitação (em mm) e umidade relativa de 14 a 17 de julho de 2011 (SOMAR METEOROLOGIA, 2011)	54
Figura 3 -	Resumo ilustrativo do período experimental e dos procedimentos experimentais adotados – Brotas, 2011.....	55
Figura 4 -	Mensuração da temperatura retal	57
Figura 5 -	Mensuração da temperatura da superfície testicular	57
Figura 6 -	Mensuração do comprimento testicular.....	58
Figura 7 -	Mensuração da largura testicular	58
Figura 8 -	Realização da pesagem dos touros	58
Figura 9 -	Ultrassom AQUILA VET Pie Medical utilizado no experimento.....	59
Figura 10 -	Imagens ultrassonográficas do corte transversal (6,0 MHz), do parênquima testicular, em modo B, do aparelho AQUILA VET, Pie Medical, classificada em escore (0-4): Sendo 0 o MENOS ecogênico e 4 o MAIS ecogênico de acordo com a heterogeneidade do parênquima	60
Figura 11 -	Bolsa confeccionada pra mimetizar a insulação escrotal	62
Figura 12 -	Escore 1: Túbulos seminíferos com epitélio seminífero com grande número de espermatozoides nos túbulos seminíferos e lúmen	64
Figura 13 -	Escore 2: Túbulos com epitélio seminífero apresentando desorganização arquitetural, com número reduzido de células espermáticas e vacuolização	65
Figura 14 -	Escore 3: Túbulos seminíferos com epitélio seminífero apresentando escassez de células germinativas	65
Figura 15 -	Escore 4: Túbulos seminíferos apresentando atrofia severa do epitélio germinativo	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo - 4 (pré - insulação testicular), Brotas, 201169
Tabela 2 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 0 (Início do tratamento), Brotas, 201170
Tabela 3 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 30 (período do tratamento), Brotas, 201170
Tabela 4 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 62 (período de tratamento), Brotas, 201171
Tabela 5 -	Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo -4 (pré-insulação testicular), Brotas, 201172
Tabela 6 -	Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 0 (Início do tratamento), Brotas, 201173
Tabela 7 -	Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 30 (período de tratamento), Brotas, 201173

Tabela 8 -	Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 62 (período de tratamento), Brotas, 2011	74
Tabela 9 -	Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo -4 (pré-insulação testicular), Brotas, 2011	75
Tabela 10 -	Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 0 (Início do tratamento), Brotas, 2011	75
Tabela 11 -	Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 30 (período de tratamento), Brotas, 2011	76
Tabela 12 -	Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 62 (período de tratamento), Brotas, 2011	76
Tabela 13 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo -4 (pré-insulação testicular), Brotas, 2011	78
Tabela 14 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 0 (Início do tratamento), Brotas, 2011	78
Tabela 15 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 30 (período de tratamento), Brotas, 2011	79

Tabela 16 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> no Tempo 62 (período de tratamento), Brotas, 201179
Tabela 17 -	Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos de tratamento) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> submetidos à insulação testicular, suplementados com ácidos graxos poli-insaturados e tratados com Vitamina E. Brotas, 201180
Tabela 18 -	Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos pós-insulação) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> submetidos à insulação testicular, suplementados com ácidos graxos poli-insaturados e sem tratamento sistêmico com vitamina E. Brotas, 2011.....81
Tabela 19 -	Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos pós-insulação) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> submetidos à insulação testicular, tratados sistemicamente com Vitamina E e sem suplementação de ácidos graxos poli-insaturados. Brotas, 2011.....82
Tabela 20 -	Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos pós-insulação) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros <i>Bos taurus taurus</i> submetidos à insulação testicular, grupo controle (sem suplementação com ácidos graxos poli-insaturados e sem tratamento sistêmico com vitamina E). Brotas, 201183
Tabela 21 -	Efeito da suplementação sem o tratamento sistêmico da Vitamina E sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1-parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros <i>Bos taurus taurus</i> no dia 74 (pós insulação testicular), Brotas, 201184

Tabela 22 -	Efeito do tratamento sistêmico com vitamina E sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1- parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros <i>Bos taurus taurus</i> no dia 74 (pós insulação testicular), Brotas, 2011	84
Tabela 23 -	Efeito do tratamento sem a suplementação de ácidos graxos poliinsaturados sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1- parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros <i>Bos taurus taurus</i> no dia 74 (pós insulação testicular), Brotas, 2011	84
Tabela 24 -	Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados E sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1- parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros <i>Bos taurus taurus</i> no dia 74 (pós insulação testicular), Brotas, 2011	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS TESTICULARES	28
2.1.1 Circunferência Escrotal.....	29
2.1.2 Consistência testicular.....	29
2.2 ULTRASSONOGRAFIA.....	30
2.3 HISTOLOGIA.....	32
2.4 MECANISMOS DA TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR.....	33
2.5 ESTRESSE TÉRMICO	35
2.5.1 Degeneração e Insulação Testicular.....	37
2.5.1.1 <i>Estresse oxidativo</i>	40
2.6 SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (PUFA)	42
2.7 TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES (VITAMINA E).....	43
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 GERAL.....	47
3.2 ESPECÍFICOS	47
4 HIPÓTESE	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 LOCAL	50
5.2 ANIMAIS E MANEJO ZOOTÉCNICO	50
5.3 PARÂMETROS AMBIENTAIS.....	51
5.4 GRUPOS.....	52
5.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	53
5.6 AVALIAÇÃO PRÉ - INSULAÇÃO.....	54
5.6.1 Parâmetros Avaliados.....	54
5.6.1.1 <i>Mensuração da temperatura retal e da superfície testicular</i>	54

5.6.1.2 Morfométricas testiculares.....	55
5.7 PERÍODO DA INSULAÇÃO.....	59
5.8 PERÍODO PÓS - INSULAÇÃO.....	60
5.8.1.1 Histologia testicular.....	60
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
6 RESULTADOS.....	66
6.1 RESULTADOS SEM VITAMINA E.....	66
6.2 RESULTADOS COM VITAMINA E.....	69
6.3 RESULTADOS SEM PUFA.....	71
6.4 RESULTADOS COM PUFA.....	74
6.5 EFEITOS DOS TEMPOS.....	77
6.6 RESULTADOS HISTOLOGIA.....	80
7 DISCUSSÃO.....	84
8 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro atingiu em 2010, segundo dados do IBGE (2012) 209,5 milhões de cabeças, com predominância da monta natural e da criação extensiva. No entanto, existe um enorme potencial de crescimento, sendo que, para isso, seria de fundamental importância a investigação a associação entre os fatores climáticos, especialmente temperatura ambiente, sobre as características do sêmen de reprodutores bovinos (DUARTE et al., 2005).

Cerca de 64% dos bovinos do mundo são criados em clima tropical. Porém, nestes lugares, a produtividade é menor quando são observados, por exemplo, produção de leite e carne e comparados com a produtividade em clima temperado, estando entre as causas desta situação; o baixo valor nutritivo das pastagens, as doenças e parasitas e o estresse de calor (AZEVEDO et al., 2005).

Uma maior exigência de produção dos rebanhos tem levado muitos produtores das regiões de clima tropical a optar pela aquisição de animais especializados, geralmente originários de clima temperado, os quais são pouco adaptados às condições dos trópicos, onde os fatores ambientais geralmente não se compatibilizam com a amplitude ideal de conforto térmico para eficiência ótima de desempenho dos mesmos (GLASSER, 2008). Nesse processo, a utilização destes grupos genéticos potencialmente mais produtivos pode desencadear alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas que irão afetar as funções normais dos animais (SILVA et al., 2003), atuando direta e negativamente na sua expressão genética.

Os bovinos estão constantemente susceptíveis ao estresse térmico, devido às altas temperaturas e, mesmo com seus mecanismos anatomo-fisiológicos suficientes necessários para manter a homeotermia, eles possuem prejuízos para a produção e reprodução (ALENCAR; BARBOSA; BARBOSA, 1993).

O desempenho dos bovinos das raças da sub-espécie *taurus*, quando criados em ambiente tropical, quase sempre é prejudicado, devido ao estresse calórico que reduz o consumo de alimentos, determinando inadequada economicidade ao sistema de produção.

O elevado potencial de produção desses animais, aliado à qualidade da carcaça, são motivos que levam ao estudo de meios e métodos de avaliação da capacidade dos animais se ajustarem às condições ambientais predominantes em regiões de clima quente (DOWLING, 1956).

Os touros taurinos contribuem com a precocidade sexual e de acabamento, além de características de conformação frigorífica, qualidade de carcaça, carne e crescimento (FERRAZ; ELER, 2000).

Porém a qualidade do sêmen diminui quando a temperatura testicular excede limites fisiológicos, com o consequente aumento do metabolismo do tecido e demanda de oxigênio, o que não pode ser facilmente fornecido devido ao fluxo sanguíneo limitado testicular (SETCHELL, 1998). Devido essa hipóxia o testículo fica mais susceptível ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROS).

Os espermatozoides são particularmente susceptíveis ao ataque das ROS por possuírem altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) em suas membranas e pela quantidade limitada de citoplasma. Os PUFAs melhoram a fluidez da membrana, mas tornam os espermatozoides mais susceptíveis aos danos oxidativos (GOMES; IRVINE; AITKEN, 1998).

Devido à alta quantidade desses ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma. Assim, as membranas espermáticas tornam-se susceptíveis a danos peroxidativos induzidos por radicais livres, que determinam uma substancial perda de ácidos graxos poliinsaturados, resultando em conseqüente redução da fluidez, responsável pela fusão espermatozóide-ovócito, na atividade das enzimas reguladoras que se ligam ao cálcio (Ca^{2+}) e na motilidade espermática (JONES; MANN T., SHERINS, 1979; AITKEN; BAKER, 2006).

O citoplasma reduzido, por sua vez, limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os de ação enzimática. As ROS atacam as ligações duplas (insaturações) nas moléculas, o que enfraquecem a ligação carbono-hidrogênio no átomo de hidrogênio adjacente, tornando-o susceptível a clivagem intensificando o processo oxidativo (GOMES; IRVINE; AITKEN, 1998).

Sendo assim, torne-se necessário o fornecimento de ácidos graxos poliinsaturados essenciais (Ômega-3 e Ômega-6) na dieta pode influenciar positivamente a reprodução, que permite uma maior fluidez de membrana (AITKEN;

BAKER, 2006). Entretanto altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados são perigosas para o espermatozoide devido sua susceptibilidade a ataques de radicais livres.

Uma alternativa para evitar este efeito negativo seria a associação com um tratamento antioxidante. Sabe-se que a produção de ROS por espermatozoides é um processo fisiológico normal, sendo importante em diversos mecanismos para a funcionalidade das células espermáticas (AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1992). Sendo assim, se por um lado a presença de níveis moderados de ROS é necessária à célula espermática, por outro lado o tratamento antioxidante deve ser realizado criteriosamente.

Como um antioxidante natural, a vitamina E, pode reduzir o dano oxidativo causado pela quebra lipídica presente na membrana das células e suprimir a produção de oxidantes reativos.

Assim, com o presente trabalho buscamos avaliar os efeitos da suplementação oral com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e a adição de um antioxidante como a vitamina E, em touros europeus submetidos a insulação testicular, através das avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando um faturamento de aproximadamente 50 bilhões de reais por ano e oferecendo cerca de sete milhões de empregos (LUCHIARI FILHO; MOURÃO, 2006). Ela vem se destacando na economia nacional devido sua posição de liderança no mercado mundial de carnes. O Brasil possui hoje o maior rebanho comercial do mundo e é o segundo maior produtor mundial de carne bovina com 185,1 milhões de cabeças de gado, a partir de 2003, passou a ser o maior exportador mundial (VALLE, 2011).

No Brasil, predomina a monta natural e a criação extensiva, sendo de fundamental importância investigar a associação entre os fatores climáticos, especialmente temperatura ambiente, sobre as características do sêmen de reprodutores bovinos.

Segundo Silva et al. (2003) no Brasil encontraram menores quantidades de doses por ejaculados no período de dezembro a fevereiro para a subespécie *Bos taurus taurus*. Por sua vez, Duarte et al. (2005) atribuíram esse resultado ao estresse de calor sofrido por esses animais anterior a colheita de sêmen.

Os bovinos estão constantemente susceptíveis ao estresse térmico, devido às altas temperaturas e, mesmo com seus mecanismos anatomo-fisiológicos suficientes necessários para manter a homeotermia, eles possuem prejuízos para a produção e reprodução (ALENCAR; BARBOSA; BARBOSA, 1993).

Animais de raças européias expostos ao calor apresentam seus testículos mais pendulosos quando comparado aos zebuínos, para permitir perda de calor na região testicular, entretanto, esse mecanismo nem sempre permite que o animal se adapte ao clima tropical além de torná-lo mais susceptível a traumas na região escrotal por este estar mais próximo ao solo, levando a problemas reprodutivos não apenas pelo calor, mas também por injúrias físicas no testículo (SANTIAGO, 2006).

O cruzamento industrial, busca animais com as seguintes características como maior precocidade, maior potencial de crescimento, melhor acabamento de carcaça dos animais *Bos taurus taurus* e maior adaptabilidade, boa habilidade materna, e maior resistência a parasitos dos animais *Bos taurus indicus*.

No Brasil, a maioria dos criadores de cruzamentos industriais ainda utiliza a monta natural, porém, os touros europeus possuem menor fertilidade, principalmente quando criados em condições tropicais, por isso, vem sendo estudada, as causas da menor resistência em relação aos animais *Bos taurus indicus*, ainda não foram completamente solucionadas.

Em contrapartida os touros *Bos taurus taurus* pertencem ao eixo europeu no tocante a sua origem. Considerado por alguns esta raça é uma das mais populosas do mundo. Conquistaram os cinco continentes graças à dupla aptidão, o manejo simples e de baixo custo e a capacidade de acrescentar precocidade e rendimento de carcaça em cruzamentos industriais.

2.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS TESTICULARES

A crescente demanda pela produção de proteína de origem animal como principal fonte de alimentação humana tem exigido estudos cada vez mais aprimorados em relação a reprodução bovina.

A importância do conhecimento da fertilidade potencial do touro expressa pela qualidade do sêmen, biometria testicular e capacidade de serviço (MIES FILHO et al., 1980; FONSECA et al., 1997; KROETZ et al., 2000).

O processo de fecundação depende da qualidade do oócito e dos espermatozoides, cuja função depende de sua viabilidade e potencialmente fértil (PAPA; GABALDI; WOLF, 2000).

As características do sêmen, normalmente consideradas para se avaliar a qualidade do mesmo, são os seus aspectos físicos e morfológicos (BARBOSA et al., 1991).

Sabe-se que o conhecimento das características genéticas associadas à eficiência reprodutiva dos machos é importante para auxiliar na identificação dos animais mais aptos à reprodução e que possuam genética superior para as características reprodutivas. Desse modo, faz-se necessário conhecer a magnitude do componente genético aditivo associado a essas características reprodutivas e suas inter-relações (SARREIRO et al., 2000).

2.1.1 Circunferência Escrotal

O conhecimento dos parâmetros biométricos normais do testículo de uma espécie, tais como a circunferência escrotal, largura, comprimento e o volume são de fundamental importância quando se pretende realizar uma avaliação andrológica de um reprodutor. Entre os dados da biometria testicular, a circunferência escrotal (CE) é um dos mais utilizados por ser de fácil aferição e apresentar alta correlação com peso corporal com a capacidade reprodutiva do animal, especialmente com a produção espermática (BRITO et al., 2004).

A Circunferência Escrotal (CE) é uma das características mais correlacionadas com a fertilidade de touros (CHACON et al., 1999; PARKINSON, 2004). Além disso, a medição da CE é particularmente importante no exame andrológico, sendo altamente correlacionada com a produção e da qualidade do espermatozoide (BRINKS, 1994).

2.1.2 Consistência testicular

A consistência testicular é um importante parâmetro a ser observado na constatação da normalidade fisiológica, sendo que o testículo em plena capacidade funcional apresenta consistência fibro-elástica (BICUDO, 1999).

Por outro lado, há uma forte correspondência entre as medidas escroto-testiculares e o desenvolvimento ponderal, que em associação com a idade fornecem auxílio para a seleção de indivíduos destinados à reprodução. Ressalta-se, também, a importância da consistência testicular na avaliação clínico-andrológica e produção espermática nos pequenos ruminantes (MORAES et al., 1981; BONGSO; JAINUDEEN; ZAHRAH, 1982; BORGOHAIN et al., 1983; VILAR FILHO et al., 1993).

2.2 ULTRASSONOGRAFIA

O exame ultrassonográfico dos testículos permite a avaliação da anatomia, do parênquima do órgão e de estruturas vizinhas relacionadas, como epidídimo. A ultrassonografia testicular e do escroto é realizada em medicina veterinária e humana. Ela é utilizada para avaliar mudanças palpáveis e não palpáveis, para gerar um diagnóstico diferencial entre doenças testiculares, epididimais, e escrotais, além de possibilitar a localização dos testículos retidos na cavidade abdominal (NYLAND; MATTOON 2005), sendo considerada uma valiosa técnica de diagnóstico não invasiva para avaliação de doenças testiculares em bovinos (PECHMAN; EILTS, 1987).

A ultrassonografia é considerada como um método de diagnóstico para a identificação e localizar lesões dentro dos testículos, incluindo lesões que foram ou não foram detectados por um exame digital manual (GNEMMI; LEFEBVRE, 2009, 2010).

Pechman e Eilts (1987) e Abdel-Razek e Ali (2005) identificaram as estruturas anatômicas do trato reprodutivo de touros por meio de ultrassonografia em modo B. Segundo Carvalho (2004), o modo B é conhecido como “modo de brilho” ou “modo bidimensional”. Neste tipo de representação, a intensidade do eco é visibilizada como um ponto luminoso em um monitor. Quanto maior a reflexão da onda sonora, mais intenso o brilho do ponto luminoso. As diferentes intensidades de brilho determinam a escala de cinzas.

Estruturas anecóicas são aquelas que não refletem a onda sonora, portanto, não produzem ecos e aparecem pretas em um monitor. Quando a escala de cinzas de duas estruturas é comparada, a estrutura mais escura é hipocóica enquanto a mais brilhante é hiperecóica. Se as estruturas têm o mesmo grau de brilho, elas são isoecóicas entre si (CARVALHO, 2004).

As terminologias para a interpretação e laudos de uma imagem ecográfica são classificadas segundo (SÁNCHEZ; AFONSO, 2000):

Hiperecogênico: São imagens produzidas por órgãos que refletem todo ou quase todas as ondas ultra-sônicas que incidem sobre eles, é de coloração branca no monitor do aparelho. Exemplos são tecidos ósseos, cálculos, calcificação e tecido fibroso.

Hipoecogênico: são imagens originadas de tecidos brandos, que por sua ecotextura refletem ecos em menor intensidade, os quais formam pontos menos brilhantes, com imagem cinza no monitor. Exemplos são tecidos parenquimatosos.

Anecogênicos: são imagens produzidas por estruturas que não refletem sons e transmitem as ondas incidentes. Observa-se coloração negra no monitor, como a bexiga, folículos ovarianos e cistos.

A difusão do uso da ultrassonografia, em especial nos órgãos da reprodução, é viável, pois é um método rápido e não invasivo, que aliado aos dados do exame clínico, conduz a um diagnóstico precoce dos órgãos (PECHMAN; EILTS, 1987).

Estudos de diferentes ecogenicidades testiculares facilitam o diagnóstico definitivo. Os processos inflamatórios, por exemplo, são representados por imagens ultra-sonográficas hipoecóicas (ARCHBALD; WALDON; GELLAT, 1997; SIMON; LEE; MULHALL, 2001), que são visíveis em contraste com a ecogenicidade moderada dos testículos “maduros”.

Leathem, em 1975 relata que animais criados extensivamente apresentam ecogenicidade testicular reduzida quando comparados com touros que participam de prova de ganho de peso, ou seja, criados em sistema intensivo, isso explica que, reprodutores bovinos mantidos a pasto nem sempre estão em condições de manterem uma alta taxa de fertilidade devido as altas temperaturas climáticas durante o ano.

Apesar do exame ultrassonográfico ser de grande valia para o diagnóstico precoce de enfermidades testiculares, a análise da imagem é subjetiva, pois depende da experiência do examinador. Sendo assim, instituir valores aos diferentes tons da escala de cinza possibilita a determinação quantitativa do padrão de normalidade para a ecogenicidade do parênquima testicular. Pechman e Eilts (1987) e Abdel-Razek e Ali (2005) identificaram as estruturas anatômicas do trato reprodutivo de touros adultos *Bos Taurus* por meio do exame ultrassonográfico, e relataram que o parênquima testicular é homogêneo e moderadamente ecogênico e que o mediastino testicular é uma estrutura linear de aproximadamente 5mm de largura, hiperecoica em relação ao parênquima testicular. O tecido testicular é homogêneo e moderadamente ecogênico. O mediastino do testículo possui aproximadamente de 2-4 mm de largura e esta localizado no interior do centro do testículo. O mediastino aparece como uma linha ou um círculo, quando a orientação

do transdutor é paralelo ou perpendicular, respectivamente, em relação ao eixo longo do testículo (KASTELIC; BRITO, 2012)..

No estudo de Ali et al. (2011), dez machos estéreis foram examinados por meio da ultrassonografia. Nove desses touros tiveram a qualidade do sêmen muito pobre, enquanto um touro a imagem do sêmen não pode ser avaliada devido à falta de libido. A ultrassonografia revelou a presença de lesões detectáveis em seis touros. No entanto, a verdadeira natureza dessas lesões não pôde ser estabelecida devido à falta de exame macroscópico e histopatológico.

Com base nos resultados deste estudo, pode concluir-se que a ultrassonografia é uma abordagem útil para a detecção de lesões escrotais em fases iniciais, bem como a combinação com outros métodos tais como a palpação manual, circunferência escrotal, diâmetro testicular e avaliação do sêmen para proporcionar uma análise segura da fertilidade de touros.

2.3 HISTOLOGIA

Os testículos são constituídos histologicamente por túbulos seminíferos que se apresentam como pequenos tubos revestidos internamente por epitélio estratificado composto por duas categorias de células: células de sustentação (Sertoli) responsáveis pelo suporte mecânico, nutrição e diferenciação das células germinativas; e células espermatogênicas (germinativas) que incluem vários tipos morfológicos distintos (espermatogônias, espermatócitos I e II, espermatídes e espermatozoides) (NASCIMENTO; SANTOS, 1997). O parênquima do órgão é formado pelas células de revestimento dos túbulos seminíferos e seus ductos, assim como pelas células de Leydig e de tecido conjuntivo frouxo. Os túbulos são revestidos por epitélio germinativo onde podem ser observadas células em vários estágios de desenvolvimento (BANKS, 1992).

No que se refere a degeneração testicular, os aspectos histopatológicos, se caracterizam por túbulos seminíferos diminuídos de tamanho, ocorrendo o espessamento da membrana basal, descamação do epitélio seminífero e com a presença de células gigantes. O aspecto morfológico é de fundamental importância na diferenciação entre hipoplasia e degeneração, pois na degeneração há maior

número de espermatogônias com citoplasma vacuolizado e, apesar de existir o espessamento e hialinação da membrana basal, na degeneração estas possuem um contorno irregular (BLANCHARD, 1991; LADD, 1993; ACLAND, 1998; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

A avaliação histológica do tecido testicular de touros mostrou que a exposição destes animais a duas semanas de alta temperatura pode ser o suficiente para causar degeneração do epitélio germinativo e ausência de espermatogênese. Animais mais profundamente afetados não apresentavam células mitóticas ou sincício de células de Sertoli nos túbulos seminíferos (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953).

Em casos de alteração testicular por estresse térmico, histologicamente nota-se no túbulo seminífero diminuição da espermatogênese devido a morte das células da linhagem germinativas. As espermatogônias apresentam citoplasma vacuolizado e núcleo picnótico, as espermatídes se degeneram e há aparecimento de células gigantes multinucleadas resultantes da fusão de várias espermatídes (VAN CAMP, 1997; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

2.4 MECANISMOS DA TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR

Os testículos dos touros tem por funções básicas sintetizar hormônios e realizar a espermatogênese, os mesmos encontram-se alojados no interior da bolsa testicular e a temperatura testicular mantém-se entre 2 e 6°C abaixo da temperatura corporal para que ocorra uma espermatogênese normal (KASTELIC; COOK; COULTER, 1997).

A temperatura testicular bovina não deve exceder 33-34,5 ° C (WILDEUS; ENTWISTLE, 1983; BARTH; BOWMAN, 1994).

A termorregulação escrotal e testicular é um processo de manutenção da temperatura dos testículos. Vários fatores contribuem, incluindo a estrutura peduncular do escroto e a vascularização testicular que, por meio do plexo pampiniforme, reduz a temperatura escrotal pela troca de calor entre o sangue circulante na artéria e veia testicular (COULTER; KASTELIC, 1994).

Uma explicação clássica para o resfriamento dos testículos está em um mecanismo de troca de calor contracorrente presente no funículo espermático. Essa troca de calor depende muito da diferença de temperatura entre artéria e veia, ou seja, da temperatura corporal e do testículo, respectivamente (GABALDI; WOLF, 2002).

Acredita-se que apenas 50% do sangue que chega pela artéria testicular irriga os testículos, trabalhando em estado de hipóxia. O significado fisiológico desta notável conformação ainda não é totalmente entendido, mas provavelmente constitui uma regulação potencial do suprimento sanguíneo, do controle hormonal e da função de termorregulação (GABALDI; WOLF, 2002).

Características anatômicas dos testículos e escroto permitem a regulação da temperatura testicular. Receptores de temperatura situados na pele escrotal podem proporcionar respostas que tendem a baixar temperatura, facilitando a sudorese (COSTA, 2007).

A pele escrotal é fina, falha em gordura subcutânea, relativamente sem pêlos, dotada de grandes glândulas sudoríparas adrenérgicas e o seu componente muscular (dartos) propicia alterar a espessura e a área superficial do escroto, além de variar a proximidade de contato dos testículos com a parede corpórea (GABALDI; WOLF, 2002; HAFEZ; HAFEZ, 2004). O músculo cremáster e a túnica dartos, cuja ação é comandada por nervos simpáticos lombares, relaxam e contraem, afastando ou aproximando os testículos da área inguino-abdominal, posicionando-os em resposta a temperatura do meio ambiente, o que facilita a preservação do gradiente de temperatura abdominotesticular (KASTELIC; COOK; COULTER, 2000; GABALDI; WOLF, 2002).

O músculo cremáster se contrai para aproximar os testículos do corpo em situações de frio. No entanto, infelizmente a túnica dartos é um músculo estriado e, portanto, não sustenta a contração por muito tempo (KASTELIC; COOK; COULTER, 2000).

Os touros zebuínos apresentam uma superfície de pele mais extensa e com maior número de glândulas sudoríparas, além de uma termogênese menor que os taurinos, características que permitem aos zebuínos ter uma melhor termorregulação, tornando-os mais resistentes ao estresse térmico. Diferenças individuais na área da superfície corporal, no número de glândulas sudoríparas, na

característica do escroto, do cone vascular e na termogênese podem determinar essa desigualdade entre os animais, influenciando na susceptibilidade ao calor, denominando um touro termo-sensível ou termo-resistente (ENTWISTLE, 1992).

Por eventuais falhas no mecanismo de termorregulação animal, ou ainda devido as altas temperaturas ambientais que superam esses mecanismos, o animal estará susceptível ao estresse térmico, podendo ocasionar a infertilidade (GABALDI; WOLF, 2002).

2.5 ESTRESSE TÉRMICO

A maior parte do território brasileiro fica entre a linha do Equador, que corta o país na região norte, e o trópico de Capricórnio, que passa no Sudeste. O clima é um dos componentes ambientais que exerce efeito mais pronunciado sobre o bem-estar animal e, por consequência, sobre a produção e produtividade. É considerado, portanto, fator regulador ou mesmo limitador da exploração animal para fins econômicos (PEREIRA, 2005).

A temperatura média do ar está geralmente situada acima dos 20°C, sendo que, nas horas mais quentes do dia, as temperaturas observadas permanecem acima dos 30°C em grande parte do ano, atingindo a faixa de 35°C a 38°C (TITTO, 1998).

Baccari (1998) relata que o ambiente é composto de estressores que interagem e inclui todas as combinações nas quais os organismos vivem. O estresse climático é causado pelos elementos climáticos, principalmente a temperatura, umidade, velocidade do ar e a radiação solar, podendo afetar o crescimento, a produção de leite e a reprodução dos animais.

Estresse por calor é um problema particularmente grave em bovinos. Mais de 64% da população bovina está localizado nos trópicos e estimou-se que o estresse por calor provoca a grave perda econômica (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000).

A temperatura ambiente é o fator de maior importância na espermatogênese dos machos de qualquer espécie e, quando muito elevada (da ordem de 34,5°C), é prejudicial tanto às etapas de formação dos espermatozoides como àqueles elementos já formados e em trânsito pelo epidídimo (MIES FILHO, 1987).

No touro, por exemplo, onde a espermatogênese demora cerca de 61 dias, a alteração do sêmen ocorre cerca de duas semanas após o estresse térmico e não retorna ao normal até oito semanas após o final do estresse de calor (DOWLING, 1956).

Fonseca e Chow (1995) induziram o processo degenerativo em touros zebuínos (insulação escrotal), por 7 dias, e observaram profundas alterações morfológicas, decréscimo na concentração e motilidade espermáticas. Em concordância, recentemente, Brito et al. (2003) descreveram aspectos importantes da indução da degeneração testicular, também em touros *Bos taurus indicus*, verificaram que as alterações de núcleo espermático, caracterizadas pela presença de vacúolos nucleares, foram bem proeminentes. Provavelmente o aparecimento desses defeitos morfológicos está associado à sensibilidade das espermátides, nas fases finais da espermiogênese (VOGLER et al., 1993).

Meyerhoeffer et al. (1985), verificou que a exposição de touros *Bos taurus taurus* à elevada temperatura resultou em diminuição da qualidade seminal. Com base nesse resultado, Koivisto et al. (2008), avaliaram as características seminais de touros de origem europeia (*Bos taurus taurus*) e touros de origem indiana (*Bos taurus indicus*) sob efeito das estações do ano, criados na região sudeste do Brasil. Foi notada uma maior tolerância ao calor em touros zebus, uma vez que apresentaram melhor motilidade, vigor e morfologia espermáticas, quando comparados às características seminais dos touros europeus. Além disso, a congelabilidade seminal desses últimos variou consideravelmente ao longo do ano, mas em ambos genótipos, a congelabilidade foi melhor no inverno do que no verão.

Os animais que habitam as regiões de clima quente ficam submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) que pode ser definido como um ambiente quente que atua alterando a temperatura corporal do animal para um valor acima da temperatura ideal. O estresse térmico pode diminuir taxas de concepção, aumentar mortalidade embrionária em vacas (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000) e diminuir a qualidade seminal de touros (BRITO et al., 2002). Estudos tem mostrado que o aumento da temperatura testicular, causada pela insulação escrotal resulta em diminuição da motilidade progressiva e concentração espermática, aumento das anormalidades morfológicas, na porcentagem de lesão acrossomal, bem como alterações das características do plasma seminal (VOGLER et al., 1993; BRITO et

al., 2002). Essas alterações observadas nas células espermáticas são consequências da degeneração testicular, principal alteração causada pelo efeito das altas temperaturas testiculares.

2.5.1 Degeneração e Insulação Testicular

A degeneração testicular ocorre, principalmente, nos animais que vivem em condições climáticas desfavoráveis. O clima tropical, por apresentar altas temperaturas, facilita o aparecimento de alterações no epitélio seminífero, com consequentes efeitos na qualidade do sêmen (RAO; BANE, 1984). Esse processo constitui a principal causa de redução da fertilidade nos machos (NASCIMENTO; SANTOS, 1997), sendo mais encontrada nos touros de origem europeia do que nos zebuínos (VALE FILHO et al., 1979).

Segundo Fuerst-Waltl et al. (2006) a principal causa de degeneração deve-se às condições tropicais, caracterizada por altas temperaturas ambientais nas quais os animais são criados.

Com o aumento da temperatura os touros como os demais animais homeotermos, são capazes de manter a temperatura corpórea constante na presença de alterações consideráveis de temperatura ambiente. Eles tendem a buscar meios que os ajudem a alcançar homeostase: buscam sombra, aumentam ingestão de água, diminuem os períodos de pastejo, diminuem atividades físicas, entre outros. Na ausência ou restrição destes recursos ambientais a homeostase fica comprometida e o animal entra em estresse térmico. Touros pouco adaptados a climas mais quentes se desgastam mais rapidamente e, no decorrer da estação de monta, debilitam-se ao ponto de diminuir sua vida útil no rebanho. Em alguns casos, em uma mesma estação de monta, existe a necessidade de realizar revezamentos do período de atividade com períodos de descanso. No entanto diversos recursos de seleção para adaptação e manejo podem e vêm sendo utilizados para garantir o bom desempenho de raças precoces e de alta produção de carne (PARANHOS DA COSTA, 2002).

A degeneração testicular pode ser uma alteração adquirida, uni ou bilateral, temporária ou permanente e sua gravidade depende do tipo, severidade e duração do insulto (SETCHELL, 1998). Pode ser causada por distúrbios de saúde, principalmente, quando acompanhados de febre, toxemia ou infecção local, assim como outras alterações que elevem a temperatura testicular, tais como: infecções ou traumas, lesões vasculares, varicocele, dermatite ou excesso de gordura escrotal, edema e hidrocele. Além disso, fatores auto-imunes, obstrução da cabeça do epidídimo, agentes químicos, físicos e fatores hormonais também predis põem à degeneração testicular (NASCIMENTO; SANTOS, 1997).

Mesmo quando o estado geral do animal e a libido são normais, os testículos podem apresentar consistência e volume alterados. Inicialmente, a consistência é flácida e, se não removida a causa, a degeneração torna-se crônica com redução do tamanho testicular podendo progredir para atrofia, tornando-se fibroso e mais firme à palpação, nestes casos distúrbio total na espermatogênese pode ser observado (VAN CAMP, 1997).

Na degeneração leve ou moderada, há possibilidade de recuperação completa da função testicular, pois as espermatogônias tronco, células de Sertoli e de Leydig possuem resistência relativa, permitindo o restabelecimento da espermatogênese por volta de 60 dias após a remoção do agente causal (NASCIMENTO; SANTOS, 1997). De acordo com Van Camp (1997), estabelecer diagnóstico e prognóstico seguros para degeneração testicular depende da realização detalhada da anamnese, exame clínico geral e andrológico, com avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen em exames consecutivos, visando evitar o descarte de touros com base em apenas uma avaliação, pois estes, uma vez recuperados, readquirem a fertilidade normal.

Ao exame clínico externo podem ser visualizadas alterações anatômicas no tamanho, peso e textura dos testículos. Durante o exame de palpação dos testículos, a observação de pequeno volume na cauda dos epidídimos, diminuição rápida do perímetro escrotal e redução na consistência testicular sugerem diminuição na espermatogênese e degeneração do tecido testicular (BARTH, 1993).

Barth e Bowman (1994) acreditam que no caso de degeneração testicular em consequência de estresse térmico, os efeitos deletérios podem tanto ser exercidos por ação local como através de alterações no padrão de secreções hormonais.

Gabaldi (2000) afirma que nas espécies em que os testículos encontram-se fora da cavidade abdominal, envolvidos pelo escroto, “a função testicular pode ser afetada não somente pela alteração da temperatura corporal, mas também pelo calor que é aplicado diretamente nos testículos, como por exemplo, a insulação escrotal” sendo esta ultima situação mais efetiva no momento da temperatura testicular.

Os efeitos da temperatura testicular elevada têm sido extensivamente estudados em bovinos através da insulação testicular. E, para isso, a insulação testicular tornou-se o método de escolha para imitar os efeitos do estresse térmico ambiental sobre as células da espermatogênese em condições controladas (BARTH; BOWMAN, 1994).

A técnica para se obter tal efeito consiste em bloquear ou reduzir a capacidade termorregulatória dos testículos por meio do acoplamento de uma bolsa térmica ao escroto. Esta técnica consiste em isolar os testículos do animal em uma bolsa plástica isolante térmica, internamente forrada com lã (RAO, 1967), náilon (VOGLER et al., 1993) ou tecido de algodão (JANUSKAUSKAS et al., 1995), cuja função é minimizar as trocas de calor entre os testículos e o meio ambiente.

No trabalho de Wildeus e Entwistle (1983), foram utilizados animais mestiços *Bos indicus* X *Bos taurus* os quais foram insulados por 48 horas. O sêmen foi colhido a cada 2 ou 3 dias e todos os touros foram abatidos 23 dias após a insulação. Não houve efeito negativo na produção diária de espermatozóides dos animais insulados durante o período estudado, mas o aumento de temperatura testicular ocasionou o aparecimento das seguintes anomalias espermáticas: cabeças isoladas (6 a 14 dias pós insulação), defeitos de acrossomo (12 a 23 dias), anomalias de cauda (12 a 23 dias) e gotas protoplasmáticas (17 a 23 dias). As espermátides e os espermatozóides na cabeça do epidídimo foram mais sensíveis à elevação da temperatura. Houve redução de aproximadamente 50% do número de células estocadas no epidídimo, supostamente devido à absorção seletiva de espermatozóides anormais na *rete testis* e no ducto deferente.

Devido a alta temperatura local, acompanhada da hipóxia tecidual causada pela degeneração testicular, o organismo animal sofre o estresse oxidativo (SETCHELL, 1998).

2.5.1.1 *Estresse oxidativo*

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Entre eles, pode-se citar, como exemplo, a nutrição inadequada e a permanência dos animais em condições de estresse. O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todas as espécies reativas do oxigênio são radicais livres, e estes nem sempre são oxidantes (Maia, 2006). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (SOUZA; FERREIRA, 2007).

Atualmente existe um crescente interesse nos estudos com espécies reativas do oxigênio, em virtude de ter sido demonstrado que vários sistemas sofrem modificações funcionais devido aos danos causados por sua elevada produção, interferindo nas suas estruturas e funções (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIVLIN et al. 2004).

A exposição a elevadas temperaturas altera o mecanismo de termorregulação testicular, em consequência do aumento da temperatura da superfície do escroto (KASTELIC; COOK; COULTER, 2000), causando danos nas células germinativas, o qual resulta em falhas na espermatogênese, degeneração do epitélio germinativo gonadal (SETCHELL 1998; KASTELIC et al., 1997) e reduções na qualidade espermática (MOREIRA; MOURA; ARAÚJO, 2001). Além disso, a condição de estresse térmico promove também um quadro de hipóxia testicular, uma vez que a hipóxia ocorre quando a tensão de oxigênio é reduzida abaixo da requerida para a função normal celular em um tecido específico. Esse efeito é possivelmente uma resposta ao fluxo sanguíneo inadequado no tecido ou redução na capacidade de transporte de oxigênio (HOCKEL; VAUPEL, 2001).

Os espermatozoides são muito sensíveis aos danos oxidativos devido ao fato de apresentarem na constituição da membrana plasmática, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Estes danos favorecem a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), responsáveis pela redução da viabilidade (HSU et al.,

1998) e da motilidade espermática em ejaculados (AITKEN; BAKER, 2002). Outra causa da sensibilidade espermática aos danos causados pelas EROs, pode ser explicado devido às baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (AITKEN, 1995) e, ejaculados com problemas morfológicos, particularmente a presença de gota proximal e distal podem produzir uma maior quantidade de EROs (GOMES; IRVINE; AITKEN, 1998).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de EROS, que ao ter contato com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática, em especial o DHA, retiram uma molécula de hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez, irá agir em outro ácido graxo poliinsaturado. Este mecanismo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais espermáticas, além da perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e mudanças no metabolismo celular (AITKEN; KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002).

Segundo Block (1991) e colaboradores, o ataque dos ácidos graxos poliinsaturados e a reação em cadeia da peroxidação lipídica, causam desorganização na arquitetura da membrana plasmática, que por sua vez faz com que haja perda da função celular. Desta forma, a habilidade do espermatozoíde em iniciar os eventos de fusão, reação acrossômica e penetração no oócito fica comprometida, o que resulta na perda da capacidade de fertilização do espermatozoíde.

As EROs também podem produzir extensos danos à composição proteicas das membranas, modificar o citoesqueleto celular, bem como causar alterações nos mecanismos fisiológicos celulares (SHARMA; AGARWAL, 1996). Entre as espécies reativas ao oxigênio, podem ser citadas as seguintes: o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), sendo o radical hidroxila a mais reativa e prejudicial ao espermatozoíde (HALLIWELL, 1991).

2.6 SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (PUFA)

A relação entre a nutrição e a capacidade reprodutiva dos machos tem recebido uma especial atenção especialmente quanto ao nível energético das dietas. Em machos adultos as necessidades em relação a conteúdo de energia na dieta para os processos reprodutivos, estão relacionadas ao preenchimento das exigências nutricionais para manutenção do peso e produção espermática (MOSS; DUNN, 1992.).

O aumento no desempenho reprodutivo tem se relacionado com as propriedades de alimento funcional que possuem os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (BRIAN; JOSEPH; BRUCE, 1992). Alimentos funcionais são todos aqueles ingredientes que, quando fornecidos regularmente apresentam propriedades benéficas além das nutricionais básicas, favorecendo uma ou mais funções alvo no corpo (COLLA; MORAES, 2006). Segundo esta definição é possível afirmar que alimentos ricos em PUFA podem ser considerados alimentos funcionais.

Além da função energética, os lipídeos também são componentes celulares de membranas biológicas. Em todas as espécies (MARTIN RILLO; MARTINEZ; GARCIA ARTIGA, 1996), os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por conterem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados – PUFAs, o que sugere que a composição de lipídios e ácidos graxos dos espermatozoides pode ser um fator determinante das taxas de fertilidade (MCDOWELL, 1989).

Estes ácidos graxos poliinsaturados dão à membrana plasmática do espermatozoide a fluidez de que necessita para participar nos eventos de fusão da membrana associadas com a fertilização (ALVAREZ; STOREY, 1995; AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989).

Os PUFAs da série ômega 3 e ômega 6 são ácidos graxos essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados pelos animais e precisam ser fornecidos pela ração. Eles são materiais oxidáveis, por possuírem duplas ligações que formam radicais livres ao se juntarem ao O₂ metabólico, dando origem aos peróxidos (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989).

Porém os danos causados nos espermatozoides advêm da alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidáveis em suas membranas, que o torna vulnerável à ação dose agentes oxidantes (radicais livres) bem como sensíveis à peroxidação lipídica (BILODEAU et al., 2002). Quando as espécies reativas de oxigênio atacam as duplas ligações associadas aos ácidos graxos insaturados, uma reação em cadeia de peroxidação lipídica é iniciada. Caso esta reação, não seja paralisada, leva a uma perda da permeabilidade da membrana e consequentemente da função espermática (AITKEN; BACKER, 2002).

Um dos antioxidantes mais utilizados na membrana é a vitamina E, que neutraliza o radical livre evita o dano celular, que ocasiona desarranjos metabólicos como, por exemplo, a inibição de atividades enzimáticas (MCDOWELL, 1989).

Segundo Saunders (2003), a duração da espermatogênese no touro é de 54 dias, justificando a recomendação para fornecer alimentação adequada principalmente durante os dois meses que antecedem a estação reprodutiva (ROBINSON et al., 2006).

2.7 TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES (VITAMINA E)

Antioxidantes são substâncias que apresentam função biológica e reduzem ou previnem a oxidação do substrato, resultando em um agente redutor mais potente (HICKS, 2001).

Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos.

- *Antioxidantes enzimáticos*: são conhecidos como antioxidantes naturais. Eles neutralizam as ERO excessivas e previnem danos da estrutura celular. São compostos pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx).

- *Antioxidantes não enzimáticos*: são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Fazem parte do sistema não enzimático, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico,

ácido α -lipoico (NORDBERG; ARNÉR, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutationas, betacaroteno e caroteno (MAIA, 2006). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A vitamina E é o nome genérico de uma série de compostos lipossolúveis chamados tocoferóis e tocotrienóis. Dentre estes compostos, a forma biologicamente mais ativa é a α -tocoferol, que é a mais comumente encontrada nos alimentos (FERREIRA et al., 2007; CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003).

A vitamina E tem papel de antioxidante e de formação estrutural das membranas biológicas, além promover a integridade morfológica e funcional dos músculos esqueléticos, cardíacos, lisos, e sistemas vasculares periféricos. Outra forma de atuação da vitamina, no organismo, é o seu papel coadjuvante da resposta imunológica (CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003).

Estudos comprovam que a vitamina E é um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo*. Estas substâncias atuam como captador de radicais livres e reparador das membranas celulares (BANSAL; BILASPURI, 2009).

O tocoferol está presente na dupla camada lipídica de membranas celulares. Supõe-se que a cadeia lateral do tocoferol mistura-se com os ácidos graxos de cadeia longa da membrana celular. Neste local, o tocoferol atua como antioxidante para proteger a membrana celular dos efeitos nocivos de EROS. Os ácidos graxos poliinsaturados contêm a configuração de $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, em que o hidrogênio no átomo de carbono central é facilmente removido, resultando na formação de EROS (BANSAL; BILASPURI, 2009, 2010). Os elétrons livres reajustam-se, e é adicionado oxigênio para formar um peróxido. Os peróxidos podem romper-se para formar dois oxidantes, resultando numa reação de cadeia autopropagadora. Os antioxidantes fornecem hidrogênio para as EROS e as estabilizam. O antioxidante torna-se um radical livre, mas tem a propriedade de poder reajustar-se em um conjunto estável e, dessa maneira, interromper a reação de propagação (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993; KUMAR; MAHMOOD, 2001).

A vitamina E é o principal antioxidante da membrana das células e atua como proteção contra a ação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e nas partículas sub-celulares, evitando sua oxidação, estabilizando a fração lipídica, impedindo a formação de lipoperóxidos tóxicos aos vasos sanguíneos, aumentando a resistência das células ao peróxido de hidrogênio e destruindo os peróxidos livres formados. Como os lipoperóxidos e os peróxidos são autotóxicos, podendo destruir neutrófilos e macrófagos, essa vitamina protege não só as membranas e seus receptores, mas também outros componentes celulares envolvidos na modulação da resposta inflamatória (SOUZA; FERREIRA, 2007; NICOLODI et al., 2010). A forma como o α -tocoferol atua na estabilização dos radicais livres recém-formados é pela formação do radical tocoferoxil, porém ele é incapaz de reverter os danos ocorridos em função da oxidação ocorrida (SOUZA; FERREIRA, 2007).

A diminuição da concentração de EROS ou o aumento do sistema antioxidante reduz o estresse oxidativo e os danos causados por ele. A suplementação oral com moléculas antioxidantes aumenta a concentração dessas substâncias no plasma seminal reduzindo o estresse oxidativo durante a espermatogênese. A análise das substâncias antioxidantes e a avaliação da peroxidação lipídica poderão indicar a taxa de estresse oxidativo aos quais as células espermáticas estão sendo submetidas (LANZAFAME, 2009).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

3.1 GERAL

Avaliar os possíveis efeitos da suplementação oral com ácidos graxos poli-insaturados (com vs. sem) e a ação protetora do tratamento sistêmico com vitamina E (com vs. sem) contra os danos oxidativos causados pelo estresse térmico testicular em touros taurinos insulados.

Através das avaliações morfométricas testiculares, ultrassonográficas e histológicas.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com vitamina E e suplementação com PUFA nas avaliações:

- Ultrassonográfica: avaliar os efeitos dos tratamentos propostos sobre a ecogenicidade do parênquima testicular.
- Morfométrica testicular (i.e, volume, temperatura, consistência, circunferência): avaliar os efeitos dos tratamentos propostos sobre as morfométricas testiculares.
- Histológica dos testículos: avaliar os efeitos dos tratamentos propostos sobre o epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos.

HIPÓTESE

4 HIPÓTESE

1. A suplementação oral com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) promove um ambiente favorável no testículo de touros *Bos taurus* insulados, porém as células testiculares ficam mais susceptíveis ao ataque das ROS;
2. A adição de antioxidante como a vitamina E fornece subsídios para suprimir o ataque das ROS nas células testiculares de touros *Bos taurus taurus* causados pelo estresse térmico.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento se estendeu do dia 14 de Julho de 2011 ao dia 29 de setembro de 2011, totalizando 78 dias.

5.1 LOCAL

O presente experimento foi conduzido nos seguintes locais:

- Fazenda Paineiras, localizada na cidade de Brotas, estado de São Paulo. Realização do experimento a campo.
- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus da Cidade Universitária, na cidade de São Paulo-SP. Experimento laboratorial, realização dos exames histológicos.

O clima da região de Brotas-SP de acordo com a classificação de Koppen é tropical de altitude com inverno seco (Köppen: Aw), com temperatura média mínima de 15,3°C e máxima de 27,0°C.

5.2 ANIMAIS E MANEJO ZOOTÉCNICO

Foram utilizados 16 touros jovens com idade média de 2 anos de idade, de origem *Bos taurus taurus* (**Figura 1**). Todos os animais foram previamente submetidos ao exame andrológico e apresentaram perfil espermático normal, segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) sendo considerados aptos reprodutivamente.

Durante o período do experimento os animais receberam sal mineral e água limpa *ad libitum*, foram vermifugados e banhados com ectoparasiticidas.

Os animais foram mantidos em áreas de pastagens com predominância de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*).

Figura 1 - Lote de touros utilizados no experimento

Fonte: ROCHA, 2011.

A alimentação dos animais consistia de pastagem natural, cana picada (15 Kg/MS) e cevada (2,5 Kg/MS) fornecido duas vezes ao dia sendo distribuído nos cochos dos piquetes onde os animais permaneceram.

5.3 PARÂMETROS AMBIENTAIS

Os parâmetros ambientais de temperatura do ar (TA) e umidade relativa do ar (UR) foram adquiridos pela Somar Metereologia, referentes aos dias da insulação escrotal. Totalizando um período de 96 horas (**Figura 2**).

Figura 2 - Dados de temperatura mínima e máxima (em graus Celsius), precipitação (em mm) e umidade relativa de 14 a 17 de julho de 2011

JULHO					
	Observado				Média Climatológica
	14/07/11	15/07/11	16/07/11	17/07/11	
Temp. mínima (°C)	12,0	10,8	9,9	11,0	11,1
% da média	108%	97%	89%	99%	
Temp. máxima (°C)	27,8	27,5	28,9	29,5	23,3
% da média	119%	118%	124%	127%	
Precipitação (mm)	0,0	0,0	0,0	0,0	21,0
% da média	0%	0%	0%	0%	
Umidade relativa mínima (%)	30	27	29	31	66
% da média	45%	41%	44%	47%	
Umidade relativa máxima (%)	86	88	83	76	83
% da média	104%	106%	100%	92%	

Fonte: (SOMAR METEOROLOGIA, 2011).

5.4 GRUPOS

Os animais foram distribuídos em quatro grupos com quatro animais em cada grupo:

Grupo I: (n=4) PUFA (Megalac® E¹) fornecido 4 Kg ao dia por 62 dias, divididos em duas vezes ao dia a partir da retirada da bolsa térmica (17/07/2011) + 5 ml de Vitamina E (Monovin® E²), administrada por via subcutânea a cada 13 dias, após a retirada da bolsa, durante 62 dias (15/09/2011);

¹ **Megalac® E** – QGN- Arm & Hammer®

² **Monovin® E** - Bravet®

Grupo II: (n=4) PUFA (Megalac® E¹) fornecido 4 Kg ao dia por 62 dias, divididos em duas vezes ao dia, a partir da retirada da bolsa térmica;

Grupo III: (n=4) 5 ml de Vitamina E (Monovin® E²) administrada via subcutânea a cada 13 dias após a retirada da bolsa durante 62 dias;

Grupo IV: (n=4) Controle, recebeu 5 ml de óleo mineral (placebo), via subcutânea, nos mesmo dias em que os outros grupos receberam vitamina E.

5.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante o estudo, todos os animais dos grupos GRUPO I (n=4), GRUPO II (n=4), GRUPO III (n=4), GRUPO IV (n=4) foram submetidos ao mesmo manejo e procedimentos. O estudo foi delineado no modelo de blocos ao acaso, em que cada animal foi considerado uma unidade experimental, com 4 repetições para cada um dos 3 tratamentos. O arranjo dos tratamentos foi o tipo fatorial 2x2 (PUFA com vs sem e Vitamina E com vs sem). A fim de adequar o processo de análise dos dados obtidos, o período experimental de 78 dias (11 semanas) foi dividido em três fases de análises período de pré insulação, insulação, pós insulação (**Figura 3**).

Figura 3 - Resumo ilustrativo do período experimental e dos procedimentos experimentais adotados – Brotas - 2011

Fonte: ROCHA, 2011.

5.6 AVALIAÇÃO PRÉ - INSULAÇÃO

As avaliações foram realizadas no dia 14 de julho, momentos antes da insulação testicular, nos 16 touros. Os parâmetros avaliados foram:

- Mensuração da temperatura retal e da superfície testicular, morfometria testicular (circunferência escrotal, consistência, temperatura, comprimento e largura testicular), peso corporal e ultrassonografia testicular.

5.6.1 Parâmetros Avaliados

Parâmetros avaliados durante o experimento.

5.6.1.1 Mensuração da temperatura retal e da superfície testicular

Durante todo o experimento, nos dias das análises a temperatura retal e da superfície testicular foram monitoradas antes da realização do exame ultrassonográfico.

A temperatura retal foi mensurada através do uso de termômetro clínico (**Figura 4**), introduzido via retal após o reto ser limpo e pós 2 minutos a temperatura foi lida.

A mensuração da temperatura da superfície testicular foi realizada utilizando um termômetro digital infravermelho com Mira Laser com escala de -32°C a 380°C dotado de visor indicativo de cristal. Este aparelho foi posicionado a aproximadamente 30 cm de distância do escroto, por 30 segundos (**Figura 5**).

Figura 4 - Mensuração da temperatura retal

Fonte: ROCHA, 2011.

Figura 5 - Mensuração da temperatura da superfície testicular

Fonte: ROCHA, 2011.

5.6.1.2 Morfométricas testiculares

Para realizar as avaliações dos parâmetros morfométricos como a circunferência escrotal (CE), comprimento dos testículos direito e esquerdo (CTD e CTE), largura dos testículos direito e esquerdo (LTD e LTE) e consistência testicular do testículo direito e esquerdo (CSTD e CSTE), os testículos foram tracionados e posicionados paralelamente para realizar as avaliações citadas da seguinte forma:

- Circunferência Escrotal (CE), obtidos com uma fita métrica;
- Comprimento Testículo Direito e Esquerdo, em milímetros, sentido dorso-ventral (CTD e CTE) (**Figura 6**) e a largura dos testículos direito e esquerdo (LTD e LTE), em milímetros, na região mediana dos testículos, do sentido lateral para o medial (**Figura 7**) foram obtidos com um paquímetro;

Figura 6 - Mensuração do comprimento testicular

Fonte: ROCHA, 2011.

Figura 7 - Mensuração da largura testicular

Fonte: ROCHA, 2011.

- Consistência Testicular correspondeu ao padrão fibro-elástico, sendo avaliada a consistência do testículo direito (CSTD) e o testículo esquerdo (CSTE), com classificação em escala de 1 a 5 (flácida a firme).

A pesagem individual foi realizada a cada treze dias com uma fita métrica para pesagem de bovinos (**Figura 8**).

Figura 8 - Realização da pesagem dos touros

Fonte: ROCHA, 2011.

Após a realização das mensurações das temperaturas testicular e retal, peso corporal e morfométricas testiculares iniciou-se o exame ultrassonográfico.

5.6.1.3 Ultrassonografia testicular

Os exames ultrassonográficos foram realizados com o aparelho de ultrassom Pie Medical AQUILA VET (**Figura 9**), ligado a um transdutor linear de 6,0 MHz. Após a aplicação do gel acústico diretamente sobre o escroto, foram realizadas varreduras em planos frontais nos testículos direito e esquerdo. A cada realização dos exames ultrassonográficos o aparelho era calibrado da mesma maneira quanto à intensidade de brilho e também quanto a posição do foco principal.

Figura 9 - Ultrassom AQUILA VET Pie Medical utilizado no experimento

Fonte: ROCHA, 2011.

Para a avaliação do parênquima testicular, o gel de contato foi colocado sobre o escroto posicionando-se a sonda no plano longitudinal, com movimentos de varredura sobre a superfície escrotal. Avaliou-se a ecotextura do parênquima testicular do testículo direito (TD) e testículo esquerdo (TE).

As imagens foram transferidas para o computador e foram avaliadas de forma subjetiva de acordo com o grau de ecogenicidade do parênquima testicular, sendo classificados em escore de 0 a 4, de acordo com a imagem obtida de cada testículo (**Figura 10**), sendo 0 (zero) referente a maior ecogenicidade e a 4 (quatro) a menor ecogenicidade. As imagens foram gravadas e avaliadas por dois avaliadores diferentes. Para a análise estatística a média das duas avaliações foi utilizada.

Figuras 10 - Imagens ultrassonográficas do corte transversal (6,0 MHz), do parênquima testicular, em modo B, do aparelho AQUILA VET, Pie Medical, classificada em escore (0-4): Sendo 0 o MENOS ecogênico e 4 o MAIS ecogênico de acordo com a heterogeneidade do parênquima

Escore 0

Escore 1

Escore 2

Escore 3

Escore 4

Fonte: ROCHA, 2011.

Após a avaliação do parênquima testicular as imagens foram separadas em testículo direito (TD), testículo esquerdo (TE) e foram separados pelos grupos de cada tratamento.

5.7 PERÍODO DA INSULAÇÃO

O período de insulação começou dia 14 de julho e terminou dia 17 de julho, totalizando 96 horas (Tempos -4 e 0). Os 16 touros tiveram o escroto envolvido por uma bolsa confeccionada para causar uma insulação térmica uma insulação térmica. A bolsa era revestida por duas camadas de algodão na pele escrotal, uma folha de papel de feltro para a parte intermediária e uma folha de papel laminado para envolver a parte externa com a fixação de esparadrapo (**Figura 11**).

Durante o período da insulação todos os animais permaneceram com a bolsa térmica e estiveram soltos a pasto, onde havia água e sal à vontade.

Figura 11- Bolsa confeccionada pra mimetizar a insulação escrotal

Fonte: ROCHA, 2011.

5.8 PERÍODO PÓS - INSULAÇÃO

No momento da retirada da bolsa no dia 17 de julho (Tempo 0), foram aferidos os parâmetros citados no período pré-insulação: peso corporal, temperatura retal e testicular, comprimento, largura, consistência e circunferência testicular, e as avaliações do parênquima testicular. Em seguida os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, com 4 animais cada (fatorial 2x2).

Após a retirada da bolsa térmica dos 16 touros, os tratamentos propostos abaixo foram iniciados. Após 62 dias, o tratamento foi parado. As avaliações continuaram foram novamente realizadas nos dias 15 de agosto (Tempo 30) e 15 de setembro (Tempo 62).

5.8.1.1 Histologia testicular

No dia 28 de setembro 74 dias após a retirada da bolsa após a insulação foi realizada a orquiectomia total dos touros. Os animais foram submetidos ao jejum hídrico e alimentar por 12 horas antes da cirurgia. Sedação e analgesia seguiram o seguinte protocolo: (Cloridrato de xilazina 1%, na dosagem de 0,2 mg/kg de xilazina IM) e a área incisada foi anestesiada com Cloridrato de Lidocaína na dosagem de 10 mL de lidocaína 2% intratesticular (pele, túnicas e funículos espermáticos).

O procedimento cirúrgico iniciou-se com incisões laterais (IL) de aproximadamente oito centímetros praticadas na pele do escroto e túnica vaginal, no sentido do ápice da bolsa escrotal, sem unir as incisões, mas permitindo boa visualização e exposição do testículo e, conseqüentemente, do ligamento ínguino-testicular. A porção superior da túnica vaginal foi separada, o mesórquio restante foi isolado até atingir o máximo de adelgamento do cordão espermático que foi ligado com fio de sutura estéril (cat gut cromado 2). Cerca de três centímetros abaixo da ligadura, o cordão espermático foi emasculado para liberação total do testículo. De igual forma procedeu-se no outro testículo. A região incisada foi curada com cicatrizante (Sulfadiazina de prata) e repelente (Fipronil) tópicos. Durante o pós-

operatório, os animais receberam antibióticoterapia com Cloridrato de Oxitetraciclina 10% longa ação 1mL/Kg peso vivo, IM, SID, dose única. A analgesia foi realizada por inibidor seletivo das cicloxigenases 1 e 2 (Flunixin Meglumine 1 mL/ 45Kg de peso vivo), IM, BID, durante 3 dias.

Após a retirada dos testículos eles foram cortados em fragmentos de 10 mm de espessura por 20 mm de comprimento da parte medial do testículo. Os fragmentos foram fixados em formaldeído 10% até o processamento. Depois os fragmentos foram recortados, desidratados, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, microtomizado com cinco micrômetros de espessura e corados pela hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

A leitura das lâminas foi realizada pela microscopia ótica, a avaliação do epitélio seminífero foi em aumento de 40X com a classificação de escore (1-4):

Escore 1: Túbulos seminíferos com epitélio seminífero com grande número de espermatozoides nos túbulos seminíferos e lúmen (**Figura 12**).

Escore 2: Túbulos com epitélio seminífero apresentando desorganização arquitetural, com número reduzido de células espermáticas e vacuolização (**Figura 13**).

Escore 3: Túbulos seminíferos com epitélio seminífero apresentando escassez de células germinativas (**Figura 14**).

Escore 4: Túbulos seminíferos apresentando atrofia severa do epitélio germinativo (**Figura 15**).

Figura 12 - Imagem de histologia testicular apresentando classificação tipo
Escore 1

Fonte: ROCHA, 2011.

Figura 13 - Imagem de histologia testicular apresentando classificação tipo
Escore 2

Fonte: ROCHA, 2011.

Figura 14 - Imagem de histologia testicular apresentando classificação tipo Escore 3

Fonte: ROCHA, 2011.

Figura 15 - Imagem de histologia testicular apresentando classificação tipo Escore 4

Fonte: ROCHA, 2011.

Após a avaliação do epitélio seminífero as imagens foram separadas em testículo direito (TD), testículo esquerdo (TE) e foram separados pelos grupos de cada tratamento.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. A avaliação do efeito dos tempos de avaliação (Dias -4, 0, 30 e 62) ou de tratamentos (Grupo I, II, III e IV) e da interação entre tempos e grupos foi utilizado o PROC MIXED de medidas repetidas no tempo. Para estas análises era utilizado o teste Least Significant Differences (LSD).

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre os diferentes tempos e grupos.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os resultados de cada diferente variável estudada e pertinente a cada grupo realizado serão demonstrados nas tabelas abaixo. Cada tabela contém as informações sobre cada tempo do período experimental.

6.1 RESULTADOS SEM VITAMINA E

Tabela 1 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo - 4 (pré - insulação testicular) – Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	340,75 ± 20,65	326,50 ± 26,91	0,6891
Circunferência Escrotal (cm)	28,00 ± 1,41	27,50 ± 1,44	0,8128
Profundidade TD (mm)	54,25 ± 1,49	53,50 ± 3,84	0,8616
Profundidade TE (mm)	49,50 ± 4,25	52,25 ± 4,66	0,6784
ComprimentoTD (mm)	92,35 ± 10,96	97,50 ± 7,21	0,7083
Comprimento TE (mm)	87,27 ± 10,43	94,25 ± 7,50	0,6071
Consistência TD (1-5)	2,87 ± 0,31	2,50 ± 0,28	0,4136
Consistência TE (1-5)	2,75 ± 0,32	2,62 ± 0,23	0,7663
Ultrassom TD (1-4)	2,18 ± 0,11	2,00 ± 0,54	0,759
Ultrassom TE (1-4)	2,37 ± 0,07	2,18 ± 0,38	0,6644

Tabela 2 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 0 (Início do tratamento) - Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	366,00 ± 27,62	356,50 ± 47,36	0,8681
Circunferência Escrotal (cm)	28,00 ± 1,29	29,25 ± 1,49	0,5499
Profundidade TD (mm)	52,25 ± 2,42	50,00 ± 4,08	0,6525
Profundidade TE (mm)	46,60 ± 6,08	56,00 ± 5,58	0,2985
Comprimento TD (mm)	82,50 ± 11,15	84,75 ± 8,51	0,8779
Comprimento TE (mm)	84,00 ± 10,327	88,75 ± 7,67	0,7238
Consistência TD (1-5)	3,12 ± 0,37	1,37 ± 0,12	0,0044
Consistência TE (1-5)	2,87 ± 0,51	1,37 ± 0,12	0,0582
Ultrassom TD (1-4)	2,25 ± 0,17	2,06 ± 0,27	0,5891
Ultrassom TE (1-4)	2,50 ± 0,17	2,37 ± 0,36	0,7663

Tabela 3 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 30 (período do tratamento) – Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	376,50 ± 31,47	345,75 ± 28,15	0,4939
Circunferência Escrotal (cm)	27,25 ± 1,79	28,50 ± 1,65	0,6275
Profundidade TD (mm)	55,00 ± 4,08	48,00 ± 2,70	0,203
Profundidade TE (mm)	48,50 ± 3,66	47,75 ± 4,38	0,8999
Comprimento TD (mm)	88,75 ± 9,98	95,25 ± 8,71	0,6412
Comprimento TE (mm)	81,25 ± 8,61	92,75 ± 7,09	0,3427
Consistência TD (1-5)	3,00 ± 0,20	3,25 ± 0,14	0,3559
Consistência TE (1-5)	3,00 ± 0,20	3,25 ± 0,14	0,3559
Ultrassom TD (1-4)	2,56 ± 0,15	1,75 ± 0,72	0,3494
Ultrassom TE (1-4)	2,18 ± 0,15	2,06 ± 0,29	0,7216

Tabela 4 – Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 62 (período de tratamento) – Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	375,50 ± 22,08	367,75 ± 37,33	0,8641
Circunferência Escrotal (cm)	28,50 ± 1,04	29,50 ± 1,19	0,5504
Profundidade TD (mm)	64,00 ± 7,44	67,50 ± 10,74	0,7979
Profundidade TE (mm)	54,75 ± 4,09	55,75 ± 2,01	0,8337
Comprimento TD (mm)	90,75 ± 9,69	95,25 ± 7,81	0,7303
Comprimento TE (mm)	86,00 ± 15,43	83,00 ± 9,63	0,8744
Consistência TD (1-5)	2,62 ± 0,12	2,75 ± 0,25	0,6704
Consistência TE (1-5)	2,50 ± 0,20	2,62 ± 3,31	0,7502
Ultrassom TD (1-4)	2,31 ± 0,11	2,00 ± 0,40	0,4903
Ultrassom TE (1-4)	1,81 ± 0,31	2,06 ± 0,41	0,6464

Os valores da média e erro padrão em relação às variáveis sobre o peso corpóreo, as mensurações morfométricas testiculares e sobre a ultrassonografia do TD e TE de touros *Bos taurus taurus* tratados sem vitamina E, nos tempos -4, 30 e 62, não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os grupos tratados (sem vs com) PUFA e sem vitamina E representados nas tabelas 1, 3 e 4. Porém no tempo 0 quando a bolsa testicular foi retirada houve uma diminuição na consistência testicular do TD nos grupos tratados (sem vs com) PUFA ($3,12 \pm 0,37$ e $1,37 \pm 0,12$, respectivamente; $p = 0,0044$) (Tabela 2), no entanto consistência do testículo TE houve uma tendência significativa ($2,87 \pm 0,51$ e $1,37 \pm 0,12$, respectivamente; $p = 0,0582$; Tabela 2).

6.2 RESULTADOS COM VITAMINA E

Os resultados referentes ao tratamento com Vitamina E estão apresentados nas tabelas 5 a 8. Cada tabela contém as informações sobre cada tempo do período experimental.

Tabela 5 - Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo -4 (pré-insulação testicular) – Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	378,75 ± 47,59	371,00 ± 86,32	0,9399
Circunferência Escrotal (cm)	29,87 ± 3,25	30,50 ± 3,59	0,9017
Profundidade TD (mm)	52,50 ± 11,01	57,75 ± 5,85	0,6885
Profundidade TE (mm)	56,25 ± 5,40	54,75 ± 8,16	0,8833
Comprimento TD (mm)	88,50 ± 20,12	94,75 ± 11,34	0,7958
Comprimento TE (mm)	92,75 ± 11,18	94,50 ± 11,27	0,9158
Consistência TD (1-5)	3,12 ± 0,42	3,25 ± 0,47	0,8519
Consistência TE (1-5)	4,25 ± 0,32	3,37 ± 0,37	0,1274
Ultrassom TD (1-4)	2,41 ± 0,30	1,93 ± 0,37	0,389
Ultrassom TE (1-4)	2,62 ± 0,21	2,12 ± 0,07	0,071

Tabela 6 - Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 0 (Início do tratamento) - Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	389,25 ± 49,12	382,25 ± 97,57	0,951
Circunferência Escrotal (cm)	30,62 ± 3,43	30,00 ± 3,39	0,9012
Profundidade TD (mm)	53,00 ± 8,59	57,00 ± 6,31	0,7204
Profundidade TE (mm)	55,50 ± 3,52	54,50 ± 8,08	0,9135
Comprimento TD (mm)	74,75 ± 20,67	93,75 ± 8,98	0,4317
Comprimento TE (mm)	95,00 ± 10,36	90,00 ± 9,57	0,7351
Consistência TD (1-5)	2,62 ± 0,47	1,50 ± 0,35	0,1055
Consistência TE (1-5)	2,75 ± 0,43	1,75 ± 0,32	0,1135
Ultrassom TD (1-4)	2,25 ± 0,25	2,18 ± 0,27	0,8786
Ultrassom TE (1-4)	2,43 ± 0,32	2,87 ± 0,38	0,4231

Tabela 7 - Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 30 (período de tratamento) - Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	429,25 ± 42,80	376,00 ± 91,16	0,6160
Circunferência Escrotal (cm)	30,00 ± 3,18	29,37 ± 2,77	0,8874
Profundidade TD (mm)	53,00 ± 9,21	53,75 ± 6,88	0,9101
Profundidade TE (mm)	55,50 ± 5,04	50,50 ± 6,27	0,5575
Comprimento TD (mm)	83,25 ± 19,76	96,75 ± 6,49	0,5404
Comprimento TE (mm)	94,00 ± 11,79	89,50 ± 7,48	0,7583
Consistência TD (1-5)	3,87 ± 0,42	3,50 ± 0,35	0,5239
Consistência TE (1-5)	3,87 ± 0,42	3,75 ± 0,14	0,7908
Ultrassom TD (1-4)	1,83 ± 0,50	2,18 ± 0,46	0,6299
Ultrassom TE (1-4)	2,81 ± 0,21	2,62 ± 0,33	0,6507

Tabela 8 - Efeito da suplementação com o tratamento sistêmico com Vitamina E sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 62 (período de tratamento) - Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
PESO (Kg)	403,00 ± 57,49	380,50 ± 102,19	0,8542
Circunferência Escrotal (cm)	30,75 ± 4,09	31,25 ± 2,86	0,9235
Profundidade TD (mm)	59,75 ± 11,60	66,00 ± 8,72	0,682
Profundidade TE (mm)	62,50 ± 4,94	58,75 ± 8,87	0,7246
Comprimento TD (mm)	91,00 ± 21,16	100,00 ± 9,22	0,7101
Comprimento TE (mm)	93,25 ± 13,18	93,75 ± 8,35	0,9755
Consistência TD (1-5)	3,87 ± 0,42	2,62 ± 0,12	0,0308
Consistência TE (1-5)	3,37 ± 0,37	2,87 ± 0,42	0,4128
Ultrassom TD (1-4)	1,58 ± 0,33	1,62 ± 0,16	0,9067
Ultrassom TE (1-4)	2,18 ± 0,37	2,43 ± 0,21	0,5821

Não foi observada diferenças estatísticas sobre o peso corpóreo e as mensurações morfométricas testiculares de touros *Bos taurus taurus* tratados com vitamina E em nenhuma momento. Por outro lado, houve uma tendência estatística para um efeito do tratamento com PUFA na avaliação subjetiva do escore da ultrassonografia testicular do TE no tempo -4 ($2,62 \pm 0,21$ e $2,12 \pm 0,07$, respectivamente; $p=0,071$). Além disto, no tempo 62, observou-se diferença estatística na consistência do testículo direito dos grupos sem suplementação com PUFA em relação aos suplementados ($3,87 \pm 0,42$ e $2,62 \pm 0,12$, respectivamente; $p= 0,0308$; Tabela 8).

6.3 RESULTADOS SEM PUFA

Os resultados das tabelas 9 a 12 contêm as informações sobre cada tempo do período experimental.

Tabela 9 - Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo -4 (pré-insulação testicular) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	340,75 ± 20,65	378,75 ± 47,59	0,4916
Circunferência Escrotal (cm)	28,00 ± 1,41	29,87 ± 3,25	0,6163
Profundidade TD (mm)	54,25 ± 1,49	52,50 ± 11,01	0,8801
Profundidade TE (mm)	49,50 ± 4,25	56,25 ± 5,40	0,3644
Comprimento TD (mm)	92,35 ± 10,96	88,50 ± 20,12	0,8721
Comprimento TE (mm)	87,27 ± 10,43	92,75 ± 11,18	0,7327
Consistência TD (1-5)	2,87 ± 0,31	3,12 ± 0,42	0,654
Consistência TE (1-5)	2,75 ± 0,32	4,25 ± 0,32	0,0167
Ultrassom TD (1-4)	2,18 ± 0,11	2,41 ± 0,30	0,4631
Ultrassom TE (1-4)	2,37 ± 0,07	2,62 ± 0,21	0,3153

Tabela 10 - Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 0 (Início do tratamento) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	366,00 ± 27,62	389,25 ± 49,12	0,6943
Circunferência Escrotal (cm)	28,00 ± 1,29	30,62 ± 3,43	0,5014
Profundidade TD (mm)	52,25 ± 2,42	53,00 ± 8,59	0,9358
Profundidade TE (mm)	46,60 ± 6,08	55,50 ± 3,52	0,2527
Comprimento TD (mm)	82,50 ± 11,15	74,75 ± 20,67	0,7527
Comprimento TE (mm)	84,00 ± 10,27	95,00 ± 10,36	0,4794
Consistência TD (1-5)	3,12 ± 0,37	2,62 ± 0,47	0,4393
Consistência TE (1-5)	2,87 ± 0,51	2,75 ± 0,43	0,8588
Ultrassom TD (1-4)	2,25 ± 0,17	2,25 ± 0,25	1
Ultrassom TE (1-4)	2,50 ± 0,17	2,43 ± 0,32	0,8725

Tabela 11 - Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 30 (período de tratamento) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	376,50 ± 31,47	429,25 ± 42,80	0,3591
Circunferência Escrotal (cm)	27,25 ± 1,79	30,00 ± 3,18	0,4809
Profundidade TD (mm)	55,00 ± 4,08	53,00 ± 9,21	0,8493
Profundidade TE (mm)	48,50 ± 3,66	55,50 ± 5,04	0,3042
Comprimento TD (mm)	88,75 ± 9,98	83,25 ± 19,76	0,8121
Comprimento TE (mm)	81,25 ± 8,61	94,00 ± 11,79	0,4163
Consistência TD (1-5)	3,00 ± 0,20	3,87 ± 0,42	0,114
Consistência TE (1-5)	3,00 ± 0,20	3,87 ± 0,42	0,114
Ultrassom TD (1-4)	2,56 ± 0,15	1,83 ± 0,56	0,1762
Ultrassom TE (1-4)	2,18 ± 0,15	2,81 ± 0,21	0,565

Tabela 12 - Efeito da suplementação sem os ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 62 (período de tratamento) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	375,50 ± 22,08	403,00 ± 57,49	0,6709
Circunferência Escrotal (cm)	28,50 ± 1,04	30,75 ± 4,09	0,627
Profundidade TD (mm)	64,00 ± 7,44	59,75 ± 11,60	0,7684
Profundidade TE (mm)	54,75 ± 4,09	62,50 ± 4,94	0,2724
Comprimento TD (mm)	90,75 ± 9,69	91,00 ± 21,16	0,9918
Comprimento TE (mm)	86,00 ± 15,43	93,25 ± 13,18	0,7332
Consistência TD (1-5)	2,62 ± 0,12	3,87 ± 0,42	0,0308
Consistência TE (1-5)	2,50 ± 0,20	3,37 ± 0,37	0,0863
Ultrassom TD (1-4)	2,31 ± 0,11	1,58 ± 0,33	0,0671
Ultrassom TE (1-4)	1,81 ± 0,31	2,18 ± 0,37	0,4703

Na avaliação do efeito da vitamina E nos animais que não foram suplementados com PUFA, houve diferença estatística na consistência testicular do TE no tempo -4 (sem Vitamina E: $2,75 \pm 0,32$; com Vitamina E: $4,25 \pm 0,32$; $p=0,0167$). Entretanto nas demais variáveis estudadas não houve diferença estatística ($P>0,05$; Tabela 9).

Não foram observadas diferenças estatísticas nas variáveis analisadas nos tempos 0 e 30 (Tabelas 10 e 11). No tempo 62, o grupo sem vitamina E apresentou uma menor consistência do TD quando comparado com o grupo tratado com vitamina E ($2,62 \pm 0,12$ e $3,87 \pm 0,42$, respectivamente; $p= 0,0308$; Tabela 12). Também para a consistência testicular do TE, o grupo tratado sem vitamina E apresentou uma tendência a uma menor consistência do que o grupo tratado com vitamina E ($2,50 \pm 0,20$ e $3,37 \pm 0,37$, respectivamente; $p= 0,0863$). Por outro lado, na análise subjetiva da ultrassonografia do TD houve uma tendência a um maior escore no grupo sem vitamina E quando comparado com o grupo com vitamina E ($2,31 \pm 0,11$ e $1,58 \pm 0,33$, respectivamente; $p= 0,0671$; Tabela 12).

6.4 RESULTADOS COM PUFA

Os resultados referentes ao tratamento com PUFA estão nas tabelas 13 a 16. Cada tabela contém as informações sobre cada tempo do período experimental.

Tabela 13 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo -4 (pré-insulação testicular) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	326,50 ± 26,91	371,00 ± 86,32	0,6401
Circunferência Escrotal (cm)	27,50 ± 1,44	30,50 ± 3,59	0,468
Profundidade TD (mm)	53,50 ± 3,84	57,75 ± 5,85	0,5659
Profundidade TE (mm)	52,25 ± 4,66	54,75 ± 8,16	0,7993
Comprimento TD (mm)	97,50 ± 7,21	94,75 ± 11,34	0,8447
Comprimento TE (mm)	94,25 ± 7,50	94,50 ± 11,27	0,9859
Consistência TD (1-5)	2,50 ± 0,28	3,25 ± 0,47	0,2283
Consistência TE (1-5)	2,62 ± 0,23	3,37 ± 0,37	0,1428
Ultrassom TD (1-4)	2,00 ± 0,54	1,93 ± 0,37	0,9281
Ultrassom TE (1-4)	2,18 ± 0,38	2,12 ± 0,07	0,8833

Tabela 14 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 0 (Início do tratamento) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	356,50 ± 47,36	382,25 ± 97,57	0,8202
Circunferência Escrotal (cm)	29,25 ± 1,49	30,00 ± 3,39	0,8463
Profundidade TD (mm)	50,00 ± 4,08	57,00 ± 6,31	0,3877
Profundidade TE (mm)	56,00 ± 5,58	54,50 ± 8,08	0,8837
Comprimento TD (mm)	84,75 ± 8,51	93,75 ± 8,98	0,4947
Comprimento TE (mm)	88,75 ± 7,67	90,00 ± 9,57	0,9222
Consistência TD (1-5)	1,37 ± 0,12	1,50 ± 0,35	0,7502
Consistência TE (1-5)	1,37 ± 0,12	1,75 ± 0,32	0,3202
Ultrassom TD (1-4)	2,06 ± 0,27	2,18 ± 0,27	0,7606
Ultrassom TE (1-4)	2,37 ± 0,36	2,87 ± 0,38	0,3822

Tabela 15 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 30 (período de tratamento) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	345,75 ± 28,15	376,00 ± 91,16	0,762
Circunferência Escrotal (cm)	28,50 ± 1,65	29,37 ± 2,77	0,7959
Profundidade TD (mm)	48,00 ± 2,70	53,75 ± 6,88	0,4665
Profundidade TE (mm)	47,75 ± 4,38	50,50 ± 6,27	0,7318
Comprimento TD (mm)	95,25 ± 8,71	96,75 ± 6,49	0,8947
Comprimento TE (mm)	92,75 ± 7,09	89,50 ± 7,48	0,7635
Consistência TD (1-5)	3,25 ± 0,14	3,50 ± 0,35	0,537
Consistência TE (1-5)	3,25 ± 0,14	3,75 ± 0,14	0,0498
Ultrassom TD (1-4)	1,75 ± 0,72	2,18 ± 0,46	0,63
Ultrassom TE (1-4)	2,06 ± 0,29	2,62 ± 0,33	0,2516

Tabela 16 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* no Tempo 62 (período de tratamento) - Brotas - 2011

	SEM VIT. E	COM VIT. E	P
PESO (Kg)	367,75 ± 37,33	380,50 ± 102,19	0,9105
Circunferência Escrotal (cm)	29,50 ± 1,19	31,25 ± 2,86	0,5935
Profundidade TD (mm)	67,50 ± 10,74	66,00 ± 8,72	0,9172
Profundidade TE (mm)	55,75 ± 2,01	58,75 ± 8,87	0,7614
Comprimento TD (mm)	95,25 ± 7,81	100,00 ± 9,22	0,708
Comprimento TE (mm)	83,00 ± 9,63	93,75 ± 8,35	0,4315
Consistência TD (1-5)	2,75 ± 0,25	2,62 ± 0,12	0,6704
Consistência TE (1-5)	2,62 ± 0,31	2,87 ± 0,42	0,654
Ultrassom TD (1-4)	2,00 ± 0,40	1,62 ± 0,16	0,4258
Ultrassom TE (1-4)	2,06 ± 0,41	2,43 ± 0,21	0,4507

Para os animais suplementados com PUFA, não foram observadas diferenças estatísticas nas variáveis analisadas nos tempos -4, 0 e 62 em relação ao tratamento com Vitamina E (Tabelas 13, 14 e 16). Por outro lado, no tempo 30, o grupo que não foi tratado com vitamina E apresentou uma menor consistência testicular no TE quando comparado com o grupo com vitamina E ($3,25 \pm 0,14$ e $3,75 \pm 0,14$, respectivamente; $p = 0,0498$; Tabela 15).

6.5 EFEITOS DOS TEMPOS

Os resultados referentes aos efeitos dos tempos serão demonstrados nas tabelas abaixo.

Tabela 17 - Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos de tratamento) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* submetidos à insulação testicular, suplementados com ácidos graxos poli-insaturados e tratados com Vitamina E. - Brotas - 2011

	TEMPOS			
	-4	0	30	62
PESO (Kg)	371,00 $\pm$ 86,32	382,25 $\pm$ 97,57	376,00 $\pm$ 91,16	380,50 $\pm$ 102,19
Circunferência Escrotal (cm)	30,50 $\pm$ 3,59	30,00 $\pm$ 3,39	29,37 $\pm$ 2,77	31,25 $\pm$ 2,86
Profundidade TD (mm)	57,75 $\pm$ 5,85	57,00 $\pm$ 6,31	53,75 $\pm$ 6,88	66,00 $\pm$ 8,72
Profundidade TE (mm)	54,75 $\pm$ 8,16	54,50 $\pm$ 8,08	50,50 $\pm$ 6,27	58,75 $\pm$ 8,87
Comprimento TD (mm)	94,75 $\pm$ 11,34	93,75 $\pm$ 8,98	96,75 $\pm$ 6,49	100,00 $\pm$ 9,22
Comprimento TE (mm)	94,50 $\pm$ 11,27	90,00 $\pm$ 9,57	89,50 $\pm$ 7,48	93,75 $\pm$ 8,35
Consistência TD (1-5)	3,25 $\pm$ 0,47 ^a	1,50 $\pm$ 0,35 ^b	3,50 $\pm$ 0,35 ^a	2,62 $\pm$ 0,12 ^a
Consistência TE (1-5)	3,37 $\pm$ 0,37 ^a	1,75 $\pm$ 0,32 ^b	3,75 $\pm$ 0,14 ^a	2,87 $\pm$ 0,42 ^a
Ultrassom TD (1-4)	1,93 $\pm$ 0,37	2,18 $\pm$ 0,27	2,18 $\pm$ 0,46	1,62 $\pm$ 0,16
Ultrassom TE (1-4)	2,12 $\pm$ 0,07	2,87 $\pm$ 0,38	2,62 $\pm$ 0,33	2,43 $\pm$ 0,21

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$)

O grupo dos animais tratados com PUFA e com vitamina E, quando comparado com os tempos das análises do experimento (-4, 0, 30 e 62), apresentou diferença estatística na variável da consistência testicular do TD e TE. Houve uma diminuição no tempo 0, termino da insulação testicular, sendo que nos tempos 30 e 60 houve uma recuperação na consistência de ambos os testículos (Tabela 17).

Tabela 18 - Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos pós-insulação) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* submetidos à insulação testicular, suplementados com ácidos graxos poli-insaturados e sem tratamento sistêmico com vitamina E. - Brotas - 2011

	TEMPOS			
	-4	0	30	62
PESO (Kg)	326,50 ± 26,91	356,50 ± 47,36	345,75 ± 28,15	367,75 ± 37,33
Circunferência Escrotal (cm)	27,50 ± 1,44	29,25 ± 1,49	28,50 ± 1,65	29,50 ± 1,19
Profundidade TD (mm)	53,50 ± 3,84 ^{ab}	50,00 ± 4,08 ^{ab}	48,00 ± 2,70 ^b	67,50 ± 10,74 ^a
Profundidade TE (mm)	52,25 ± 4,66	56,00 ± 5,58	47,75 ± 4,38	55,75 ± 2,01
Comprimento TD (mm)	97,50 ± 7,21	84,75 ± 8,51	95,25 ± 8,71	95,25 ± 7,81
Comprimento TE (mm)	94,25 ± 7,50	88,75 ± 7,67	92,75 ± 7,09	83,00 ± 9,63
Consistência TD (1-5)	2,50 ± 0,28 ^b	1,37 ± 0,12 ^c	3,25 ± 0,14 ^a	2,75 ± 0,25 ^{ab}
Consistência TE (1-5)	2,62 ± 0,23	1,37 ± 0,12	3,25 ± 0,14	2,62 ± 0,31
Ultrassom TD (1-4)	2,00 ± 0,54	2,06 ± 0,27	1,75 ± 0,72	2,00 ± 0,40
Ultrassom TE (1-4)	2,18 ± 0,38	2,37 ± 0,36	2,06 ± 0,29	2,06 ± 0,41

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p>0,05)

O grupo dos animais tratados com PUFA e sem vitamina E apresentou diferenças estatísticas nos tempos 30 e 62 na variável da profundidade do testículo direito. No tempo 30, os animais apresentaram uma menor profundidade quando comparado com o tempo 62 (termino do tratamento). Por outro lado, a consistência testicular do TD apresentou-se menor no tempo 0 quando ocorreu a retirada da

bolsa e maior no tempo 30, período de tratamento com PUFA (Tabela 18). As demais variáveis como peso corporal, circunferência escrotal, profundidade do testículo esquerdo, comprimento do TD e TE, consistência do TE e ultrassonografia do TD e TE não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos estudados.

Tabela 19 - Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos pós-insulação) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* submetidos à insulação testicular, tratados sistemicamente com Vitamina E e sem suplementação de ácidos graxos poli-insaturados - Brotas - 2011

	TEMPOS			
	-4	0	30	62
PESO (Kg)	378,75 ± 47,59	389,25 ± 49,12	429,25 ± 42,80	403,00 ± 57,49
Circunferência Escrotal (cm)	29,87 ± 3,25	30,62 ± 3,43	30,00 ± 3,18	30,75 ± 4,09
Profundidade TD (mm)	52,50 ± 11,01	53,00 ± 8,59	53,00 ± 9,21	59,75 ± 11,60
Profundidade TE (mm)	56,25 ± 5,40	55,50 ± 3,52	55,50 ± 5,04	62,50 ± 4,94
Comprimento TD (mm)	88,50 ± 20,12	74,75 ± 20,67	83,25 ± 19,76	91,00 ± 21,16
Comprimento TE (mm)	92,75 ± 11,18	95,00 ± 10,36	94,00 ± 11,79	93,25 ± 13,18
Consistência TD (1-5)	3,12 ± 0,42	2,62 ± 0,47	3,87 ± 0,42	3,87 ± 0,42
Consistência TE (1-5)	4,25 ± 0,32 ^a	2,75 ± 0,43 ^b	3,87 ± 4,42 ^{ab}	3,37 ± 0,37 ^{ab}
Ultrassom TD (1-4)	2,41 ± 0,30	2,25 ± 0,25	1,83 ± 0,50	1,58 ± 0,33
Ultrassom TE (1-4)	2,62 ± 0,21	2,43 ± 3,32	2,81 ± 0,21	2,18 ± 0,37

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p>0,05)

O grupo dos animais tratados sem PUFA e com vitamina E houve uma diferença estatística na consistência testicular do TE nos tempos -4 e 0, onde no tempo 0 apresentou uma menor consistência em relação ao tempo -4, isso ocorreu devido a retirada da bolsa testicular no tempo 0 então ocorrendo uma diminuição da consistência. Nas demais tempos não foi encontrada diferenças estatísticas (tabela 19).

Tabela 20 - Efeito dos tempos (dias -4: pré-insulação testicular por 3 dias; dias 0, 30 e 62: tempos pós-insulação) sobre o peso corpóreo, mensurações morfométricas e ultrassonografia testicular de touros *Bos taurus taurus* submetidos à insulação testicular, grupo controle (sem suplementação com ácidos graxos poli-insaturados e sem tratamento sistêmico com vitamina E). - Brotas - 2011

	TEMPOS			
	-4	0	30	62
PESO (Kg)	340,75 ± 20,65	366,00 ± 27,62	376,50 ± 31,47	375,50 ± 22,08
Circunferência Escrotal (cm)	28,00 ± 1,41	28,00 ± 1,29	27,25 ± 1,79	28,50 ± 1,04
Profundidade TD (mm)	54,25 ± 1,49	52,25 ± 2,42	55,00 ± 4,08	64,00 ± 7,44
Profundidade TE (mm)	49,50 ± 4,25	46,60 ± 6,08	48,50 ± 3,66	54,75 ± 4,09
Comprimento TD (mm)	92,35 ± 10,96	82,50 ± 11,15	88,75 ± 9,98	90,75 ± 9,69
Comprimento TE (mm)	87,27 ± 10,43	84,00 ± 10,27	81,25 ± 8,61	86,00 ± 15,43
Consistência TD (1-5)	2,87 ± 0,31	3,12 ± 0,37	3,00 ± 0,20	2,62 ± 0,12
Consistência TE (1-5)	2,75 ± 0,32	2,87 ± 0,51	3,00 ± 0,20	2,50 ± 0,20
Ultrassom TD (1-4)	2,18 ± 0,11	2,25 ± 0,17	2,56 ± 0,15	2,31 ± 0,19
Ultrassom TE (1-4)	2,37 ± 0,07 ^{ab}	2,50 ± 0,17 ^a	2,18 ± 0,15 ^{ab}	1,81 ± 0,31 ^b

a, b, c: letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$)

O grupo dos animais sem PUFA e vitamina E não foram observadas diferenças estatísticas nos tempos estudados, exceto na avaliação subjetiva da ultrassonografia testicular do TE nos tempos 0 e 62, onde, no tempo 62, os animais apresentaram um menor escore quando comparado com o tempo 0 (tabela 20).

6.6 RESULTADOS HISTOLOGIA

Resultados da histologia referente a todos os grupos tratados estão apresentados nas tabelas 21 a 24.

Tabela 21 - Efeito da suplementação sem o tratamento sistêmico da Vitamina E sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1-parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros *Bos taurus taurus* no dia 74 (pós insulação testicular) - Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
TD (1-4)	3.02 ± 0.32	3.23 ± 0.12	0,5604
TE (1-4)	3.06 ± 0.34	3.07 ± 0.07	0,9741

Tabela 22 - Efeito do tratamento sistêmico com vitamina E sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1- parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros *Bos taurus taurus* no dia 74 (pós insulação testicular) - Brotas - 2011

	SEM PUFA	COM PUFA	P
TD (1-4)	2.80 ± 0.53	2.98 ± 0.23	0,7507
TE (1-4)	2.58 ± 0.49	2.93 ± 0.22	0,5018

Tabela 23 - Efeito do tratamento sem a suplementação de ácidos graxos poliinsaturados sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1- parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros *Bos taurus taurus* no dia 74 (pós insulação testicular) - Brotas - 2011

	SEM VIT.E	COM VIT.E	P
TD (1-4)	3.02 ± 0.32	2.80 ± 0.53	0,7323
TE (1-4)	3.06 ± 0.34	2.58 ± 0.49	0,4478

Tabela 24 - Efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados E sobre a avaliação do escore histológico dos túbulos seminíferos (1- parênquima normal a 4- atrofia severa do epitélio seminífero) de touros *Bos taurus taurus* no dia 74 (pós insulação testicular) - Brotas - 2011

	SEM VIT.E	COM VIT.E	P
TD (1-4)	3.23 ± 0.12	2.98 ± 0.23	0,392
TE (1-4)	3.07 ± 0.07	2.93 ± 0.22	0,5844

Em relação os valores e erro padrão da média das avaliações subjetivas da histologia dos túbulos seminíferos dos testículos direito e esquerdo (Tabelas 21 a 24), não foi constatada diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Provavelmente, ao tempo de insulação testicular de 96 horas não foi suficiente para promover alterações significativas nos túbulos seminíferos.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Os resultados de peso corporal dos animais deste experimento indicam que não houve diferença entre os grupos tratados e controle, evidenciando que a suplementação alimentar não interferiu nestas características dos animais submetidos ao estresse térmico induzido por insulação testicular (96 horas). No trabalho de Fuck, 2006 onde ele utilizou semente de linhaça (ácidos graxos poliinsaturados) para avaliar aumento de ganho de peso e melhora na qualidade reprodutiva ele não obteve diferença estatística. Já no trabalho de Hernández, (2010), ele avaliou o peso dos animais somente no começo do experimento e utilizou 200g de Megalac-E® durante 77 dias em touros europeus sobre as características qualitativas do sêmen e a utilização de ácidos graxos poliinsaturados apresentou influências positivas nas características qualitativas do ejaculado do sêmen de touros europeus.

A circunferência escrotal (C.E.) tem sido amplamente utilizado na seleção de touros por ser um excelente indicador do tamanho testicular, da capacidade de produção espermática, das características físico-químicas, da idade à puberdade e também da capacidade de fertilização (COULTER; KELLER, 1982; SILVA; DODE; UNANIAM, 1993; GRESSLER; BERGMANN; PENNA, 1998). Além de ser de fácil mensuração Cyrillo, Razook e Figueiredo (2001) citam que o C.E. apresenta herdabilidade de 0,54 e 0,44, e alta repetibilidade, indicando o potencial do C.E. na seleção de touros. No estudo de Goiozo (2008) não foi verificado efeito significativo da avaliação da circunferência escrotal de 56 touros Nelore para avaliar a eficiência reprodutiva.

Gressler, Bergmann e Penna (1998), Kroetz et al. (2000), citaram a importância da seleção da CE, pois ele tem correlação positiva com características importantes como, por exemplo, precocidade sexual de machos e fêmeas.

Para Coulter, (1986), a CE nos bovinos pode variar entre raças e entre linhagens, numa mesma raça. Assim, entre sete raças taurinas criadas no hemisfério norte, o mínimo aceitável de CE aos 24 meses de idade é de 36,0 cm para touros

Simental; 35,0 cm, Aberdeen Angus e Charolês; 34,0 cm, Horned e Polled Hereford e Shorthorn e 33,0 cm para Limousin.

Para autores como Bailey et al. (1996), sugeriram que o PE pode não ser a medida mais adequada para representar a produção espermática de touros jovens e, conseqüentemente, o potencial reprodutivo desses animais. Segundo estes autores, os testículos mais longos apresentam maior superfície de contato com o ambiente, o que facilita à termorregulação, além do que a distribuição dos vasos sanguíneos e de tecidos espermáticos é mais uniforme, assim, as formas testiculares mais alongadas seriam mais vantajosas à reprodução.

No presente estudo, os valores obtidos das mensurações testiculares não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$), evidenciando a importância de outros métodos de avaliação.

A consistência testicular é uma variável associada à redução na produção espermática e ao maior número de espermatócitos e espermátides degenerados em todos os estágios do ciclo da espermatogênese (COULTER; FOOTE 1997). No trabalho de Xavier (2007) a consistência testicular mais flácida foi observada nos animais, a partir do primeiro dia de retirada das bolsas da insulação testicular, foi menos frequente naqueles suplementados com Selênio e Vitamina E, evidenciando que o estresse térmico induzido artificialmente durante 18 dias de insulação testicular afetou em menores proporções a constituição testicular dos animais suplementados. Estes resultados corroboram com os relatos de Galbadi et al. (2000) em touros Nelore submetidos à insulação testicular por 96 horas, onde ressaltaram que na primeira semana de insulação testicular a consistência do parênquima testicular apresentou-se flácida em animais do grupo insulado. De fato, no presente estudo, verificou-se uma diminuição na consistência testicular logo após a insulação, sendo que, para todos os grupos, houve uma recuperação após 30 dias.

Hamm e Fobbe (1994) informaram que existe uma grande importância clínica no estudo das diferenças de ecogenicidade do parênquima testicular entre crianças e adultos, pois desordens testiculares, como tumores e processos inflamatórios, são tipicamente representados por lesões ultra-sonográficas hipoecóicas

No trabalho de Pechman e Eilts (1987) e Abdel-Razek e Ali (2005), o parênquima testicular de bovinos taurinos mostrou-se homogêneo e moderadamente ecogênico.

Animais criados extensivamente apresentam ecogenicidade testicular reduzida quando comparados com touros que participam de prova de ganho de peso, ou seja, criados em sistema intensivo. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que os órgãos reprodutivos de um macho adulto são mais resistentes às mudanças nutricionais que os animais imaturos (LEATHEM, 1975). Reprodutores bovinos mantidos a pasto nem sempre estão em condições de manterem uma alta taxa de fertilidade devido à diminuição da oferta de nutrientes pelas pastagens, resultantes das mudanças climáticas durante o ano (GUNN; SANDERS; GRANGER, 1942).

Estudos demonstram que a degeneração testicular leve (por causa do aumento da temperatura testicular) não alterou a aparência da ecogenicidade testicular (BRITO et al., 2003). Portanto, embora a avaliação visual da ultrassonografia testicular seja valiosa para detectar algumas formas de patologia testicular, a mesma tem valor de diagnóstico limitado na ausência de lesões macroscópicas (KASTELIC; BRITO, 2012).

Com base nos resultados de Ali et al. (2011), pode concluir-se que a ultrassonografia de diagnóstico é uma abordagem útil para a detecção de lesões escrotais em fases iniciais, bem como antes, quando utilizados em combinação com outros métodos tais como a palpação manual, medição da escrotal diâmetro da circunferência, testicular e avaliação de sêmen. Esta técnica pode ser incluída na reprodução para avaliação de touros reprodutores.

Apesar dos resultados encontrados no presente experimento indicarem que a suplementação dos ácidos graxos poli-insaturados e o tratamento sistêmico da vitamina E não apresentaram efeitos nas avaliações realizadas nos animais *Bos taurus taurus* são necessários mais estudos para verificar a eficácia de cada um dos tratamentos propostos.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste experimento, foi possível concluir que tanto a suplementação oral com ácidos graxos poli-insaturados como o tratamento sistêmico com vitamina E, associada ou isoladamente, não alteraram as características ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros de origem europeia submetidos a insulação testicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, A.; ALI, A. Development changes of bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 23-27, 2005.
- ACLAND, H. M. Sistema reprodutor do macho. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomsom**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 671.
- ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; BARBOSA, R. T. Parâmetros genéticos para peso e circunferência escrotal em touros da raça Canchim. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 22, n. 4, p. 572-583, 1993.
- ALI, K. M.; AHMAD, N.; AKHTAR, N.; ALI, S.; AHMAD, M.; YOUNIS, M. Ultrasound imaging of testes and epididymides of normal and infertile breeding bulls. **Pakistan Veterinary Journal**; v. 31, n.4, p. 345-350, 2011.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 334-336, 1995.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 183-187, 1989.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 97, p. 441-450, 1992.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497-506, 2001.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 66-69, 2006.

ARCHBALD, L. F.; WALDON, D.; GELLAT, K. Theriogenology question of the month. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 10, p. 1423-1424, 1997.

ARTHUR, P. F.; HEARNshaw, H.; STEPHENSON, P. D. Direct and maternal additive and heterosis effects from crossing *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle: cow and calf performance in two environments. **Livestock Production Science**, v. 57, p. 231-241, 1999.

AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. Á.; SATURNINO, H. M.; LANA, A. M. Q.; MACHADO, I. B.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2000-2008, 2005.

BACCARI J. R. F. Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em clima quente. In: Simpósio Brasileiro de Ambiência na Produção de Leite, Piracicaba, 1998. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 24 -67.

BAILEY, T.L.; MONKE, D.; HUDSON, R.S.; WOLFE, D. F. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. **Theriogenology**, v.46, n. 3, p. 881-887. 1996.

BANKS, W. J. Sistema reprodutor masculino. In: **BANKS, W.J. Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 546-570.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, p. 5-14, 2009.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1, 2010.

BARBOSA, R. T.; BARBOSA, P. F.; ALENCAR, M. M.; OLIVEIRA, F. T. T.; FONSECA, V. O. Biometria testicular e aspectos do sêmen de touros das raças Canchim e Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, n. 3, p. 159-170, 1991.

BARTH, A. D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.

BARTH, A. D.; BOWMAN P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 93-102, 1994.

BICUDO, S. D. **Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima**. 1999. 107f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRETZLAFF, K. N.; ELMORE, R. G. The causes and pathologic changes of testicular degeneration in large animals, **Veterinary Medicine**, v.86, n.5, p. 531-536, 1991.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M. S. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, p. 1105-1122, 2002.

BLOCK, E. R. Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 20, p. 362-369, 1991.

BONGSO, T. A.; JAINUDEEN, M. R.; ZAHRAH, A. S. Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. **Theriogenology**, Stoneham, v. 18, n. 5, p. 513-524, 1982.

BORGOHAIN, B. N.; BENJAMIN, B. R.; BARUAH, B.; JOSHI, B. C. The testicular consistence and scrotal circumference in relation to seminal characteristics among goats (*Capra hircus*). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 53, n. 11, p. 1233-1235, 1983.

BRIAN, J. W.; JOSEPH, H. H.; BRUCE, A. W. Dietary and Ruminally Derived trans-18:1 Fatty Acids Alter Bovine Milk Lipids. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 4, p. 556, 1992.

BRINKS, J. S. Relationship of scrotal circumference to puberty and subsequent reproductive performance in male and female offspring. In: FIELDS, J. J.; SAND, R. S. **Factors affecting calf crop**. Butterworths. In: M. J. FIELD; R. S. SAND, 1994. cap. 26, p. 363-370.

BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A.; KASTELIC, J. P. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

BRITO L. F.; SILVA, A. E.; UNANIAN, M. M.; DODE, M. A.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Sexual development in early- and latematuring Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 62, p. 1198-1217, 2004.

CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, A. B.; MCDOWELL, L. R. **Nutrição de bovinos à pasto**. 2. ed. Belo Horizonte: Papelform, 2003. 438 p.

CARVALHO, C. F. Bases físicas da formação da imagem ultra-sonográfica. In: CARVALHO, C.F. . **Ultrasonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 1-8.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade do macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 33, n. 1, p. 33-38, 2002.

CARTWRIGHT, T. C. Selection criteria for beef cattle for the future. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 706-711, 1970.

CASADY, R. B.; MYERS, R. M.; LEGATES, J. E. The effect of exposure to high ambiente temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 14-23, 1953.

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

COLLA, L. M.; MORAES, F. P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: Definições, Legislação e benefícios à Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

COSTA, F. Q. Degeneração térmica testicular : ocorrência, análise e solução para garantir eficiência reprodutiva de touros. **Qualittas**, 2007. Disponível em:<<http://www.qualittas.com.br>> - TCC's – Produção Animal>. Acesso em: 12 out. 2012.

COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**, v. 11, p. 297-310, 1979.

COULTER, G. H.; KELLER, D. G. Scrotal circumference of young beef bulls; relationship to paired testes weight effect to breed, and predictability. **Canadian Journal Animal Science**, v.1, n. 63, p. 133–139, 1982.

COULTER, G. H. Puberty and postpuberal development of beef bulls. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology** 2. ed. Philadelphia: Saunders co., 1986. p.142-148.

COULTER, G. H. Thermography end bull testes. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION, 12, 1988, Columbia. **Proceedings...** Columbia: National Association Animal Breeding, 1988. p. 58-63.

COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in bulls. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION, 15., 1994, **Proceedings...** Milwaukee, WI.: National Association of Animal Breeders, 1994. p. 1-14.

CHÁCON, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E.; SODDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, p. 221-231, 1999.

CYRILLO, J. N. S. G.; RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A. Estimativa de tendências e parâmetros genéticos do peso padronizado aos 378 dias de idade, medidas corporais e perímetro escrotal de machos Nelore de Sertãozinho, SP. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 56-65, 2001.

DAMASCENO, J. C.; TARGA, L. A. Definição de variáveis climáticas na determinação da resposta de vacas holandesa em sistema freestall. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 12-25, 1997.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 368-378, 1992.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER M. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 419.

DOWLING, D. F. An experimental study of the heat tolerance of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 469-481, 1956.

DUARTE, A. M.; DINIS, E. G.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; TAVARES, M.; MAITIN, R. E. C.; JACOMINI, J. O.; VIEIRA, R. C. Associação entre temperatura ambiente e características do sêmen de touros nelore, gir e holandês criados a campo. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2005.

DUPREEZ, J. H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. **Journal Veterinary Research**, v. 67, p. 263-271, 2000.

ENTWISTLE, K. Effects of heat stress on reproductive function in bulls. In: BULL FERTILITY, 1992, **Proccedings...**, 1992. p. 57-63.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. **Sumário de touros Nelore 2000**. São José do Rio Preto: Agropecuária CFM, 2000. p. 60.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 1-16, 1997.

FERREIRA, A. M. S. C.; COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C.; BRITO, O. S.; CASSETARI, M. L.; NETO, A. O. C. Suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfa-tocoferol) e a ocorrência de mastites em vacas da raça Jersey. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 2, p. 71-86, 2007.

FONSECA, V. O.; CHOW, L. A. Seminal characteristics of zebu bulls with transitory testicular degeneration. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 707-716, 1995.

FONSECA, V. O.; FRANCO, C. S.; BERGMANN, L. A.; CHOW, L. A.; ASSUMPÇÃO, T. I. Potencial reprodutivo de touros da raça nelore (*Bos taurus indicus*) acasalados com elevado número de vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, p. 53-62, 1997.

FUCK, E. J. **Desempenho produtivo e reprodutivo de caprinos machos alimentados com dieta contendo grãos de linhaça**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

FUERST-WALTL, B.; SCHWARZENBACHER, H.; PERNER, C.; SOLKNER, J. Effect of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 1-2, p. 27-37, 2006.

GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos a insulação escrotal**. 2000. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciência da Agricultura e Saúde**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.

GNEMMI, G.; LEFEBVRE, R. C. Ultrasound imaging of the bull reproductive tract: an important field of expertise for veterinarians. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practical**, v. 25, p. 767-779, 2009.

GNEMMI, G.; LEFEBVRE, R. C. Bull Anatomy and Ultrasonography of the Reproductive Tract. In: DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, J. **Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography**. London: Blackwell Publishing, 2010. p. 143-162.

GOIOZO, P. F. I. **Influências das alterações testiculares diagnosticadas pela histopatologia sobre as características biométricas, morfométricas e seminais em touros da raça nelore**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GOMES, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 81-94, 1998.

GLASER, F. D. **Aspectos comportamentais de bovinos das raças Angus, Caracu e Nelore a pasto frente à disponibilidade de recursos de sombra e água para imersão**. 2008. 117 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

GRESSLER, S. L.; BERGMANN, J. A.; PENNA, V. M. Estudo das associações genéticas entre o perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Viçosa: SBZ, 1998. v. 3, p. 368-370.

GUNN, R. M. C.; SANDERS, R. N.; GRANGER, W. Studies in fertility in sheep. 2. Seminal changes affecting fertility in rams. **Bull Commonwealth Scientific and Industrial Research Australia**, n.148, p. 1-140, 1942.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 3-12.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **The American Journal Medicine**, v. 91, n. 3, p. 14-22, 1991.

HAHN, G. L. Management and housing of farm animals en hot environments. In: YOUSEF, M. K. (Ed.). **Stress physiology in livestock**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v. 2. p. 151-174.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936 p.

HAMM, B.; FOBBE, F. Maturation of the Testis: ultrasound evaluation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, v. 21, n. 2, p. 143-147, 1994.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transaction of The Royal Society Biological Sciences**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.

HERNANDÉZ, M. M. R. **Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poliinsaturados e qualidade seminal pré e pós congelamento**. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

HICKS, J. J. **Bioquímica**. México: McGraw-Hill. 2001. 900 p.

HOCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 266-276, 2001.

HSU, P. C.; LIU, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L. Y.; YUELIANG, L. G. Effects of vitamin E and or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores do IBGE. **Estatística da Produção Pecuária**, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201202_publ_completa.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2012.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SÖDERQUIST, L.; LUNDEHEIM, N. Effects of a brief elevation of scrotal temperature on the post-thaw viability of bull semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 30, p. 271-277, 1995.

JONES, R.; MANN, T., SHERINS, R. J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertility Sterility**, v. 31, p. 531-537, 1979.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes and testicular artery to scrotal/testicular thermo-regulation in bulls at ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-261, 1997.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal testicular thermoregulation in bulls. In: CHENOWETH, P. J. (Ed.). **Topics in bull fertility**. Ithaca: IVIS, 2000. International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 08 dez. 2011.

KASTELIC, J.; COOK, R. B.; PIERSON, R. A.; COULTER, G. H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.2, n. 65, p. 111-115, 2001.

KASTELIC, J. P.; BRITO, L. F. C. Ultrasonography for Monitoring Reproductive Function in the Bull. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 3, p. 45-51, 2012.

KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; SPEAKE, B. K.; CAVALCHINI, L. G.; NOBLE, R. C. descrever os demais autores Effect of dietary supplementation with α Linolenic acid on the phospholipids fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 week of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 53-59, 1997.

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T. A.; PERRI, S. H. V.; VICENTE, W. R. R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 4, p. 01-06, 2008.

KROETZ, I. A.; TAHIRA, J. K.; PEROTTO, D.; MOLETTA, J. L. Circunfêrencia escrotal e características do sêmen de touros charolês, caracu e cruzamentos recíprocos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 2, p. 101-106, 2000.

KUMAR, H.; MAHMOOD, S. The use of fast acting antioxidants for the reduction of cow placental retention and subsequent endometritis. **Indian Journal Animal Science**, v. 71, p. 650-653, 2001.

LADDS, P. W. The male genital system. In: JUUB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v. 3, p. 485–512.

LANZAFAME, F. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. **Reproduction Biomedical Online**, v. 19, p. 638-659, 2009.

LEATHEM, J. H. Nutricional influenses on testicular composition and function in mammals. **Handbook of Physiology**, v. 5, p. 225-232, 1975.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de carne bovina no Brasil: qualidade, quantidade ou ambas? In: SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 2., 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: UPIS, 2006. Disponível em:
<<http://www.upis.br/simboi/anais/produ%E7%E3o%20de%20carne%20bovina%20no%20brasil%20-%20albino%20luchiari%20filho.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2011.

LUCHIARI FILHO, A.; MOURÃO, G. B. **Melhoramento, raças e seus cruzamentos na pecuária brasileira**. Pirassununga: LinBife, 2006. 142 p.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968. 258 p.

MAIA M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ARTIGA, C. Bora semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**, v. 31, n. 4, p. 519-526, 1996.

MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MCDOWELL, R. E.; MCDANIEL, B. T.; HOOVEN, N. W. Relation of the rhomboideus (hump) muscle in zebu and European type cattle. **Journal of Animal Science**, v. 17, p. 1229, 1958.

MCDOWELL, L. R. **Vitamin in animal nutrition**: comparative aspect to human nutrition. Washington: Academic, 1989. 486 p.

MEYERHOEFFER, D. C.; WETTEMANN, R. P.; COLEMAN, S. W.; WELLS, M. E. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 352-357, 1985.

MIES FILHO, A.; PUGA, J. M. P.; JOBIM, M. I. M.; WALD, V. B.; MATOS, S. Biometria testicular em bovino. Relação entre idade e medidas testiculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, p. 56-65, 1980.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Sulina S/A, 1987. 2 v.

MIES FILHO, A.; PUGA, J. M. P.; JOBIM, M. I. M.; WALD, V. B.; MATOS, S. Variação estacional da produção espermática e do perímetro escrotal de ovinos da raça Hampshire Down. **A hora Veterinária**, v.13, n.73, p. 53-57, 1993.

MIEUSSET, R. CASARES, P. Q.; PARTIDA, L. G. S.; SOWERBUTTS, S. F.; ZUPP, J. L.; SETCHELL, B. P. Effects of heating the testis and epididymites of ram by scrotal insulation on fertility and embryo mortality in ewes inseminated with frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 2, p. 337-344, 1992.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2812-2823, 1993.

MORAES, L. C. F.; SILVA, J. F.; PIEGAS, M. S.; MARINS, S. C. R. Considerações sobre o exame clínico andrológico em carneiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, n. 1, p. 9-15, 1981.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 6, p. 1704-1711, 2001.

MOSS, G. E.; DUNN, T. G. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1580-1593, 1992.

MOTA, L. S. **Adaptação e interação genótipo-ambiente em vacas leiteiras**. 1997. 66 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade e São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 108 p.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 93-104.

NICOLODI, P. R. S. J.; CAMARGO, E. V.; ZENI, D.; ROCHA, R. X.; CYRILO, F. C.; SOUZA, F. N.; LIBERA, A. M. M. D.; BONDAN, C.; LEAL, M. L. R. Perfil proteico e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 561-567, 2010.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology Medical**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Ultra-som diagnostico em pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. 469 p.

PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 1, p. 39-44, 2000.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. **Anais de Etologia**, v. 18, p. 26-42, 2002.

PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 215-229, 2004.

PECHMAN, R. D.; EILTS, B. E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**, v. 27, p. 431-441, 1987.

PEREIRA, J. C. C. **Fundamentos de bioclimatologia aplicados à reprodução animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005. p. 7.

RAO, A. R. Experimental testicular degeneration in a bull. **The Indian Veterinary Journal**, v. 44, n. 12, p. 1022-1024, 1967.

RAO, T. L. N.; RAO, A. R. Biometrics of spermatozoa of Ongole bulls. **Indian Veterinary Journal**, v. 61, n. 7, p. 619-620, 1984.

RAO, A. R.; BANE, A. Incidence of sperm abnormalities in infertile bulls with testicular degeneration. **Indian Veterinarian Journal**, v. 62, p. 46-49, 1984.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 518-522, 2004.

ROBINSON, E. N. Termorregulação, In: CUNNINGHAM, J. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 51, p. 427-435.

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

SÁNCHEZ, R.; ALFONSO, E. Ultra-sonografia na reprodução animal. **TecnoVet**, v. 1, p. 6, 2000.

SANTIAGO, L. L. **Distúrbios produtivos e reprodutivos em rebanho submetido ao estresse térmico**. 2006. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=1864>>. Acesso em: 20 set. 2011.

SARREIRO, L. C.; QUIRINO, C. R.; PINEDA, N. R.; BERGMANN, J. A. G. **Associações genéticas entre libido, perímetro escrotal e qualidade do sêmen de touros da raça nelore**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3. 2000. Belo Horizonte. 2000.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Versão 8. Cary: SAS, 2000.

SAUNDERS, P. T. K. Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. **Reproduction Supplement**, v. 61, p. 91–101, 2003.

SETCHELL, B. P. The functional significance of the blood-testis barrier. **Journal Andrology**, v. 1, p. 3-10, 1980.

SETCHELL, B. P. The parkers lecture - heat and the testis. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835–850, 1996.

SIMON, S. D.; LEE, R. D.; MULHALL, J. P. Should all infertile males undergo urologic evaluation before assisted reproductive technologies? Two cases of testicular cancer presenting with infertility. **Fertility Sterility**, v. 75, n. 6, p. 1226-1227, 2001.

SILVA, A. E.; DODE, M. A.; UNANIAM, M. M. Avaliação da capacidade reprodutiva do touro. In: 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. Campo Grande: EMBRAPA – CNPGC. 1993. p. 128.

SILVA, R. G. **Introdução a bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. 286 p.

SILVA, A. R.; FERRAUDO, A. S.; RODRIGUES, L. H.; COSTA, M. Z.; LIMA, V. F. M. H. Efeito da idade e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos europeus e zebus. In: ZOOTECA AMBIÊNCIA – EFICIÊNCIA E QUALIDADE NA PRODUÇÃO ANIMAL, 13., 2003, Uberaba. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 2003. v. 2, p. 56-61.

SIMPLÍCIO, A. A.; FIGUEIREDO, E. A. P.; RIERA, G. S.; FOOTE, W. C. Puberdade em cabritos da raça Moxotó no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 12, n. 2, p. 121-126, 1988.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal: meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime** [on line], v. 4, n. 3, p. 456-461, 2007. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/045V4N3P456_461_MAI2007.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2012.

SHARPE, R. M.; MCKNNELL, C.; KIVLIN, K.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertol cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003.

TITTO, E. A. L. Clima: Influência na produção de leite. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE, 1., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p.10-23.

VALE FILHO, V. R. PINTO, P. A.; FONSECA, J.; SOARES, L.C.C.V. **Patologia do sêmen; diagnóstico andrológico e classificação de Bos taurus e Bos indicus quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil** - de um estudo de 1088 touros. São Paulo: Dow Química, 1979. 54 p.

VALLE, E. R. (Org.). **Boas práticas agropecuárias: bovinos de corte: manual de orientações**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2011. 69 p. Disponível em: <http://bpa.cnpqc.embrapa.br/material/MANUAL_de%20BPA_NACIONAL.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2012.

VAN CAMP, S. D. Common causes of Infertility in the bull. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 13, p. 203-232, 1997.

VILAR FILHO, A. C.; BIRGEL, E. H.; BARNABÉ, V. H.; VISINTIN, J. A.; BARNABÉ, R. C. Características testiculares e seminais de caprinos na região semi-árida do Estado da Paraíba. I. Características testiculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 17, n. 1-2, p. 17-22, 1993.

VOGLER, C. J.; BAME, J.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207-1219, 1993.

WAITES, G. W. H.; SETCHELL, B. P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Londres: Churchill Livingstone, 1990. v. 2, p. 1-105.

WEST, W. J. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 21-35, 1999.

WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K. W. Spermogram and sperm reserves in hybrid Bos indicus 9 Bos taurus bulls after scrotal insulation. **Journal Reproduction Fertility**, v. 69, n. 2, p. 711–716, 1983.

WOLFENSON D, ROTH Z, MEIDAN R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 535–547, 2000.

XAVIER, G. C. **Efeito da suplementação alimentar com selênio + vitamina “e” em caprinos submetidos à insulação escrotal**. 2007. Faculdade de Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.