

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS DA RAÇA
NELORE DE BAIXA E ALTA EFICIÊNCIA ALIMENTAR
SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS PROTEGIDOS
EM PASTAGEM**

**Guilherme Fazan Rossi
Médico Veterinário**

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS DA RAÇA
NELORE DE BAIXA E ALTA EFICIÊNCIA ALIMENTAR
SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS PROTEGIDOS
EM PASTAGEM**

Guilherme Fazan Rossi

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Co-orientadores: Dr. Enilson Geraldo Ribeiro

Dr. Fábio Morato Monteiro

Dra. Flávia Fernanda Simili

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Reprodução Animal).**

R831p Rossi, Guilherme Fazan
Parâmetros reprodutivos de machos da raça Nelore de baixa e alta eficiência alimentar suplementados com ácidos graxos protegidos em pastagem / Guilherme Fazan Rossi. -- Jaboticabal, 2017
xix, 99 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Gisele Zoccal Mingoti
Co-orientadores: Enilson Geraldo Ribeiro, Fábio Morato Monteiro, Flávia Fernanda Simili.
Banca examinadora: André Maciel Crespilho, Joaquim Mansano Garcia, Letícia Zoccolaro Oliveira, Roberta Carrilho Canesin.,
Bibliografia

1. CAR. 2. Embrião. 3. Lipídeos. 4. Sêmen. 5. Touros. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
*e-mail: guilhermemedvet@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

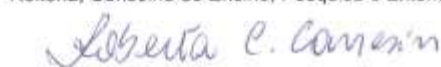
TÍTULO: PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS DA RAÇA NELORE DE BAIXA
E ALTA EFICIÊNCIA ALIMENTAR SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS
GRAXOS PROTEGIDOS EM PASTAGENS

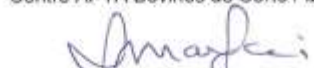
AUTOR: GUILHERME FAZAN ROSSI
ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI
COORIENTADORA: FLÁVIA FERNANDA SIMILI
COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO
COORIENTADOR: ENILSON GERALDO RIBEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
FMVA / UNESP - Araçatuba


Prof. Dr. ANDRÉ MACIEL CRESPILHO
Reitoria, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão / UNISA / Sao Paulo/SP


Pesquisadora Dra. ROBERTA CARRILHO CANESIN
Centro APTA Bovinos de Corte / IZ - Sertãozinho/SP


Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. LETÍCIA ZOCCOLARO OLIVEIRA
Departamento de Patologia e Clínica Veterinária / UFF / Niterói/RJ

Jaboticabal, 26 de maio de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guilherme Fazan Rossi: Filho de Oswaldo Durival Rossi Jr e Maria Angélica F. Fazan Rossi, nascido em 08 de novembro de 1985, natural de Jaboticabal, São Paulo. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em agosto de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em julho de 2010. Durante a graduação realizou Iniciação Científica durante três anos, sob orientação da Profa. Dagmar Diniz Cabral, junto ao Departamento de Parasitologia, com bolsa do CNPq/UFU, referentes aos projetos no B-001/2006, B-001/2007 e B-003/2008. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, área de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2011, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e co-orientação Dr. Fábio Morato Monteiro, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal na mesma instituição, sob a orientação da Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti e co-orientações Dr. Fábio Morato Monteiro, Dra. Flávia Fernanda Simili e Dr. Enilson Geraldo Ribeiro. No ano de 2014 realizou doutorado sanduíche, pelo Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior - CAPES (BEX 11820/2013-06), pela "Michigan State University - USA", sob a orientação do Prof. James Richard Pursley. Durante o período do doutorado foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, sob processo no 2013/13696-3).

EPÍGRAFE

Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.

Ayrton Senna

No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.

Ayrton Senna

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmã:

Oswaldo, Maria Angélica e Marita.

À minha esposa e filha:

Carla e Alícia.

Vocês são muito importantes.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A minha irma, Marita Fazan Rossi, e principalmente aos meus pais, Oswaldo Durival Rossi Junior e Maria Angélica Ferrarini Fazan Rossi que sempre me motivaram e deram total confiança nas minhas escolhas e no meu trabalho, sem a ajuda de vocês nada disso seria realizado.

À minha esposa Carla Ramos Gazotto pelo amor que temos, pelo companherismo e sempre me apoiando nos momentos bons e difíceis.

À minha filha Alícia Gazotto Rossi pela alegria e pelo verdadeiro significado da palavra amor.

À todos da minha família pelo apoio nessa trajetória.

À minha orientadora, Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pelo aceite de orientação desse estudo, pela oportunidade de convívio e aprendizado e pelo exemplo e inspiração profissionais.

Aos meus co-orientadores Dr. Fábio Morato Monteiro, Dra. Flávia Fernanda Simili e Enilson Geraldo Ribeiro, que ajudaram em todas as fases do estudo e que tornaram tudo isso possível.

Aos Pesquisadoras do Instituto de Zootecnia (IZ), especialmente Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Dra. Roberta Carrilho Canesin, pela colaboração, ajuda nas correções e no desenvolvimento desse estudo.

À todos os funcionários do IZ que fizeram com que todo o trabalho de campo funcionasse da melhor maneira possível.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelos ensinamentos que passou desde o mestrado, os quais, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional.

Aos funcionários Roberta, Ivo, Edson e Isabel pela enorme ajuda nos trabalhos laboratoriais e concício ao longo desta jornada.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.

Aos professores e funcionários da UNESP de Jaboticabal e Pós Graduação, pela qualidade de ensino e ajuda durante esses anos de pesquisa.

Ao Departamento de Reprodução Animal, ao Laboratório de Nutrição Animal e ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da UNESP-Jaboticabal pela oportunidade e acolhida, e a todos servidores pela ajuda nas análises laboratoriais.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, em especial ao Departamento de Apoio a Produção e Saúde Animal, Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira e Devani Mariano Pinheiro, pelo auxílio e apoio nas dosagens hormonais.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal, Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa e Camila de Paula Freitas Dell'Aqua, pelo apoio e ajuda nas análises seminais.

Aos amigos de Pós-Graduação Érika, Dayane, Aderson, Anelise, Natália, André Lasmar e Henrique pela amizade e enorme apoio nos trabalhos de campo e laboratoriais.

Aos colegas de Pós-Graduação que compartilharam parte de seu tempo e conhecimento para ajudar o desenvolvimento desse estudo.

À todos os estagiários pela colaboração e apoio durante a execução desse experimento e companheirismo em todos os momentos.

À todos os meus amigos mesmo sem imaginarem, colaboram para o meu crescimento e estão sempre presentes nos bons e maus momentos.

À FAPESP, pela bolsa de estudo e apoio financeiro fundamental para a realização desta pesquisa.

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduiche no exterior muito importante para meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e Dr. Marcelo Roncoletta componentes da banca examinadora de qualificação pela colaboração.

Ào Prof. Dr. André Maciel Crespilho, Dr. Roberta Carrilho Canesin, Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e Profa. Dra Letícia Zoccolaro Oliveira componentes da banca examinadora pela disponibilidade e colaboração nas correções desse estudo.

A todos aqueles que mesmo não estando citados aqui fizeram ou fazem parte da minha vida e torcem ou contribuem para o meu progresso pessoal e profissional.

A todos meus sinceros agradecimentos.

APOIO FINANCEIRO

Esse estudo foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº 2015/06733-5. A mesma agência concedeu bolsa de doutorado, sob processo nº 2013/13696-3. E a CAPES pela bolsa de Doutorado Sanduiche no Exterior BEX 11820/2013-06.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	xix
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1 Puberdade e maturidade sexual	5
2.2 Ultrassonografia testicular	6
2.3 Avaliação andrológica	9
2.4 Criopreservação espermática	10
2.5 Análise computadorizada de avaliação espermática	12
2.6 Citometria de fluxo	13
2.7 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE)	14
2.8 Nutrição na reprodução de bovinos	15
2.9 Consumo alimentar residual (CAR) e características reprodutivas em touros ..	16
2.10 Suplementação com ácidos graxos (AGs) na qualidade seminal de bovinos	17
2.11 Concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios relacionados à eficiência alimentar e suplementação com AGs	18
3. Hipóteses	21
4. Objetivos	21
4.1 Geral	21
4.2 Específicos	22
5. Material e Métodos	22
5.1 Local e animais	22

5.2 Delineamento experimental	23
5.3 Avaliações da pastagem e dados climáticos.....	27
5.4 Avaliações de consumo alimentar.....	28
5.5 Características de crescimento	29
5.6 Concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios	30
5.7 Ultrassonografia testicular.....	31
5.8 Avaliação andrológica	32
5.9 Criopreservação do sêmen.....	34
5.10 Avaliações do sêmen pós-descongelação	36
5.10.1 Avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA)	36
5.10.2 Teste de termorresistência rápido (TTR)	36
5.10.3 Integridade da membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo	36
5.10.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	37
5.11 Análise dos dados.....	39
6. Resultados e Discussão	40
6.1 Dados climáticos, características do pasto e consumo alimentar	40
6.2 Concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios	46
6.3 Ultrassonografia testicular.....	52
6.4 Avaliação andrológica	57
6.5 Citometria de fluxo e teste de termorresistência rápido (TTR).....	62
6.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	66
7. Conclusões	68
8. Referências	68
9. Anexos	97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Percentual dos ingredientes e composição química dos suplementos fornecidos para machos jovens da raça Nelore.26
- Tabela 2.** Consumo de massa seca (CMS), ganho médio diário, características da pastagem e perfil de ácidos graxos de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, do pastejo simulado, de acordo com as estações do ano.41
- Tabela 3.** Consumo alimentar e características de crescimento de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.44
- Tabela 4.** Metabólitos sanguíneos e hormônios de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.48
- Tabela 5.** Características ultrassonográficas testiculares de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.53
- Tabela 6.** Características reprodutivas e seminais de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.58
- Tabela 7.** Análises de citometria de fluxo e do teste de termorresistência rápido do sêmen pós descongelamento de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.63
- Tabela 8.** Produção *in vitro* de embriões de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fontes de ácidos graxos (AGs) protegido.67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Delineamento experimental mostrando a divisão dos grupos de acordo com os tratamentos e ano.....24
- Figura 2.** Cochos para suplementação em cada piquete.25
- Figura 3.** Análise de pixels das imagens ultrassonográficas do parênquima testicular em plano longitudinal e transversal pelo software Image Pro Plus versão 7.01.....32
- Figura 4.** Imagens ultrassonográficas Doppler para determinação do diâmetro e do fluxo sanguíneo da artéria testicular.....32
- Figura 5.** Delineamento experimental mostrando a divisão dos grupos para criopreservação espermática de acordo com o tratamento e ano.....35
- Figura 6.** Temperatura mensal máxima e mínima (°C) e precipitação pluviométrica (mm) durante o período experimental (anos 2015 e 2016).40
- Figura 7.** Concentração plasmática mensal de glicose (ng/dL) de touros jovens da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.46
- Figura 8.** Concentração plasmática de colesterol (ng/dL) mensal de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.50
- Figura 9.** Concentração plasmática de HDL (ng/dL) mensal de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.51
- Figura 10.** Pixels médio mensal do parênquima testicular de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.54

- Figura 11.** Pico de velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) mensais da artéria testicular de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.56
- Figura 12.** Motilidade, defeitos maiores, defeitos totais e concentração espermática mensal de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.59
- Figura 13.** Perímetro escrotal (PE) e concentração de testosterona plasmática (ng/mL) de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.59
- Figura 14.** Velocidade de trajeto (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) mensais de amostras seminais de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.60
- Figura 15.** Velocidade de trajeto (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) encontradas pelo teste de termorresistência rápida (30 min - 46°C) de amostras seminais de touros jovens Nelore em pastejo suplementados (AGs) ou não com fonte de ácidos graxos protegido (Controle).65

LISTA DE ABREVIATURAS

- % - Porcentagem
- $\mu\text{g/mL}$ - micrograma por mililitro
- μL - microlitro
- $\mu\text{L/mL}$ - microlitro por mililitro
- μm - micrometro
- μM - micromolar
- $\mu\text{m/s}$ - micrometro por segundo
- $\mu\text{U/mL}$ - Micro unidades por mililitro
- AGPs - ácidos graxos poliinsaturados
- AGs - ácidos graxos
- AIC - Critério de Informação de Akaike
- ALH - amplitude de deslocamento lateral de cabeça do espermatozoide
- Alt. forragem - altura de forragem
- ALTG - altura de garupa
- APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
- BCF - frequência de batimento flagelar cruzado do espermatozoide
- BIC - Critério de Informação Bayesiano
- BSA - albumina do soro bovino
- CA - consumo alimentar
- CAR - consumo alimentar residual
- CASA - Computer-Assisted Semen Analysis
- CEUA - Comissão de Ética de Uso de Animais
- CIV - cultivo *in vitro* de embriões
- cm - centímetro
- cm/s - centímetros por segundo
- cm^2 - centímetro quadrado
- CMS - consumo de massa seca
- CNPq - Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
- CO_2 - dióxido de carbono
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COCs - complexos *cumulus*-oócitos
- Cr_2O_3 - óxido de cromo

DHA - ácido docosa-hexaenóico
DIC - com contraste diferencial de interferência de fase
DNA - ácido desoxirribonucleico
DPA - ácido docosapentaenóico
DPC - Diagnostic Products Corporation
ECC - escore de condição corporal
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
EE - extrato etéreo
EF - excreção fecal
EPM - erro padrão da média
FAPESP - Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo
FDA - fibra insolúvel em detergente ácido
FDN - fibra insolúvel em detergente neutro
FDNi - fibra insolúvel em detergente neutro indigestível
FITC-PSA - aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
FIV - fecundação *in vitro*
FSH - hormônio folículo estimulante
g - força em função da gravidade da Terra
g - grama
 g/m^2 - gramatura por metro quadrado
GMD - ganho médio diário
h - horas
 H_2 - Hidrogênio molecular
H342 - Hoechst 33342
ha - hectare
hCG - gonadotrofina coriônica humana
HDL - lipoproteínas de alta densidade
HEPES - N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
Hz - Hertz
IA - inseminação artificial
IATF - inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IP - índice de pulsatilidade da artéria testicular
IR - índices de resistência da artéria testicular

IZ - Instituto de Zootecnia
kg - quilograma
LDL - lipoproteínas de baixa densidade
LIN - linearidade espermática
LSMEANS - método dos quadrados mínimos
m - metros
m² - metros quadrados
mg - miligrama
mg/mL - miligrama por mililitro
Mhz - megahertz
min - Minuto
MIV - maturação oocitária *in vitro*
mL - mililitro
MM - matéria mineral
mm - Milímetro
mM - Milimolar
MP - motilidade progressiva
MPAI - membrana plasmática e acrossomal íntegras
MPIAL - membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada
MPLAI - membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra
MPLAL - membrana plasmática e acrossomal lesionadas
MS - Matéria seca
MSF - massa seca da forragem
MT - motilidade total
mW - Milliwatts
n-3 - ácido linolênico
n-6 - ácido linoleico
NDT - nutrientes digestíveis totais
ng - nanograma
ng/dL - nanograma por decilitro
ng/mL - nanograma por mililitro
nm - nanômetro
nº - Número
°C - graus Celsius

P378 - pesos aos 378 dias de idade
PB - proteína bruta
PC - peso corporal
PC^{0,75} - peso corporal metabólico
PDIFF - probabilidade da diferença usando o teste "t"
PE - perímetro escrotal
pH - colog da concentração hidrogeniônica do meio
PI - iodeto de propídio
PIVE - produção *in vitro* de embriões
PVC - policloreto de polivinila
RAP - espermatozoides com velocidade rápida
RIA - radioimunoensaio
SAS - Statistical Analysis Software Institute
SFB - soro feral bovino
sptz - espermatozoides
sptz/mL - espermatozoides por mililitro
STR - progressividade espermática
TALP - Tyrode's Albumin Lactate and Piruvate
TCM-199 - Tissue culture medium 199
TE - transferência de embrião
TNT - tecido não tecido
TTR - teste de termorresistência rápida
UA - unidade animal
UI/mL - unidade internacional por mililitro
UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
VAP - velocidade média de trajeto do espermatozoide
VCL - velocidade curvelinear do espermatozoide
VDF - velocidade diastólica final da artéria testicular
VPS - velocidade de pico sistólico da artéria testicular
VSL - velocidade em linha reta do espermatozoide

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 017361/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da suplementação com fonte de ácidos graxos poliinsaturados na puberdade e nas características seminais de machos da raça Nelore selecionados para consumo alimentar residual"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Gisele Zoccal Mingoti está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de setembro de 2013.

Jaboticabal, 06 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS DA RAÇA NELORE DE BAIXA E ALTA EFICIÊNCIA ALIMENTAR SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS PROTEGIDOS EM PASTAGEM

RESUMO

As dietas enriquecidas com fontes de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) para touros jovens no período da puberdade a maturidade sexual podem exercer efeito positivo no desempenho reprodutivo. Além disso, selecionar animais jovens de melhor eficiência alimentar (baixo consumo alimentar residual - CAR) é muito importante para os programas de melhoramento genético. Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros reprodutivos de machos jovens da raça Nelore de baixa e alta eficiência alimentar suplementados com ácidos graxos (AGs) protegidos em regime de pastagem. Foram utilizados 48 machos jovens com média de $14,3 \pm 0,13$ meses de idade e peso de $389,5 \pm 5,43$ kg. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2×2 (CAR x suplementação) sendo, 24 animais baixo ou negativo CAR com ou sem suplementação com AGs e 24 alto ou positivo CAR com ou sem suplementação com AGs. As dietas experimentais foram isoproteicas. O período de suplementação foi de dezembro à outubro. Os animais foram mantidos em pastagem de capim-marandu, em lotação contínua e taxa de lotação fixa. As mensurações de características de crescimento, de consumo alimentar, concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios, avaliação andrológica e ultrassonografia testicular foram realizadas a cada 28 dias, dos 14 aos 24 meses de idade. A criopreservação espermática foi realizada na última colheita, momento em que os animais apresentavam 24 meses de idade. Após descongelamento foram realizadas avaliações computadorizadas da cinética espermática (CASA), teste de termorresistência rápida (TTR), integridade da membrana plasmática e acrossomal e produção *in vitro* de embriões (PIVE). Os dados foram analisados pelo procedimento PROC MIXED do SAS. Os touros de baixo CAR apresentaram peso corporal inicial maior ($398,0 \pm 5,4$) do que os de alto CAR ($380,9 \pm 5,4$) e mantiveram a diferença durante todo o experimento ($P < 0,05$). Os animais que receberam suplementação com AGs protegido apresentaram maiores concentrações plasmática de colesterol, lipoproteína de alta densidade (HDL) e testosterona ($161,5 \pm 3,2$ ng/dL, $67,2 \pm 1,6$ ng/dL e $12,2 \pm 0,6$ ng/mL, respectivamente) em relação aos tratamentos sem AGs ($124,5 \pm 3,2$ ng/dL, $57,9 \pm 1,6$ ng/dL e $10,5 \pm 0,6$ ng/mL, respectivamente) ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para consumo alimentar, ecotextura testicular, análise do sêmen fresco e PIVE ($P > 0,05$). No entanto, para a avaliação do sêmen pós-descongelamento, as velocidades espermáticas (VAP - de trajeto, VSL - em linha reta e VCL - curvilínea; $\mu\text{m/s}$) analisadas pelo CASA foram maiores para os touros suplementados com AGs protegido ($82,6 \pm 1,6$, $68,6 \pm 1,2$ e $132,0 \pm 3,2$ para VAP, VSL e VCL, respectivamente) em relação aos que receberam suplementação sem AGs ($76,2 \pm 1,6$, $64,2 \pm 1,2$ e $122,3 \pm 3,2$; VAP, VSL e VCL, respectivamente) ($P < 0,05$). Apesar dessas diferenças de velocidade espermática, colesterol e testosterona sanguínea são necessários avaliações em conjunto com outros testes reprodutivos para determinar a real influência dos AGs na qualidade espermática.

Palavras chave: CAR, embrião, lipídeos, sêmen e touros.

REPRODUCTIVE PARAMETERS OF NELORE MALES OF LOW AND HIGH FEED EFFICIENCY SUPPLEMENTS WITH PROTECTED FATTY ACIDS IN PASTURE

ABSTRACT

Diets enriched with sources of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for young bulls from puberty to sexual maturity may have a positive effect on reproductive performance. In addition, selecting young animals with better feed intake (low residual feed intake - RFI) is very important for breeding programs. Thus, the aim of this study was to evaluate the reproductive parameters of young Nelore bulls of low and high feed intake supplemented with PUFA in the pasture. The total of 48 young males were used with a 14.3 ± 0.13 months of age and a weight of 389.5 ± 5.43 kg. The experimental design were completely randomized in a factorial 2×2 (RFI x supplementation) being 24 animals high RFI with or without supplementation with PUFA and 24 animals low RFI with or without supplementation with PUFA. The diets were isoproteic. The supplementation period was from December to October and the animals were kept in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pasture in continuous stocking during the experimental period. The measurements of growth characteristics, feed intake, plasma concentrations of metabolites and hormones, andrological evaluation and testicular ultrasonography were performed every 28 days, from 14 to 24 months of age. Sperm cryopreservation was performed at the last collections, at which time the animals were 24 months old. After thawing, computer aided semen analysis (CASA), rapid thermoresistance sperm tests (TTR), integrity of the plasma membrane and acrosomal and in vitro embryo production (IVEP) were performed. The data were analyzed by the SAS procedure PROC MIXED. The low CAR bulls have had higher initial body weight (398.0 ± 5.4) than high CAR (380.9 ± 5.4) and maintained the difference throughout the experiment ($P < 0.05$). The animals that received supplementation with PUFA had higher plasma concentrations of cholesterol, high density lipoprotein (HDL) and testosterone (161.5 ± 3.2 ng/dL, 67.2 ± 1.6 ng/dL e 12.2 ± 0.6 ng/mL, respectively) in relation to treatments without PUFA (124.5 ± 3.2 ng/dL, 57.9 ± 1.6 ng/dL e 10.5 ± 0.6 ng/mL, respectively) ($P < 0.05$). No differences were observed between treatments for feed intake, testicular ecotexture, analysis of fresh semen and IVEP ($P > 0.05$). However, sperm evaluation after thawing, the spermatoc velocities (VAP - average path velocity, VSL - straight linear velocity and VCL - curvilinear velocity; $\mu\text{m} / \text{s}$) analyzed by CASA were higher for bulls supplemented with PUFA (82.6 ± 1.6 , 68.6 ± 1.2 e 132.0 ± 3.2 para VAP, VSL e VCL, respectively) in relation for bulls without PUFA (76.2 ± 1.6 , 64.2 ± 1.2 e 122.3 ± 3.2 ; VAP, VSL e VCL, respectively) ($P < 0,05$). Despite these differences in sperm velocity, cholesterol and testosterone evaluations are needed in conjunction with other reproductive tests to determine the actual influence of PUFA on sperm quality.

Keywords: bulls, embryo, lipids, RFI e semen.

1. Introdução

No Brasil, a pecuária de corte tem grande importância econômica e social. O país é o segundo maior produtor de carne do mundo (9,6 milhões de toneladas), atrás apenas dos EUA e o segundo exportador com 1,7 milhões de toneladas por ano, atrás da Índia com 2,1 milhões de toneladas (ANUALPEC, 2016). Porém, o sistema de produção de carne bovina, que está relacionado principalmente à exploração de pastagens, necessita ser mais eficiente e produtivo. Desta forma, os principais pilares na busca por técnicas que melhorem a eficiência e a produtividade do rebanho se sustentam na nutrição e na reprodução animal.

A maturidade sexual é considerada a idade em que o animal atinge o potencial satisfatório de fertilidade. Portanto, o touro pode ser considerado sexualmente maduro quando atingir a habilidade de realizar a cópula e promover a fecundação do oócito (SCHMIDT-HEBBEL et al., 2000; BRITO et al., 2004a). De acordo com Eler (2004), existe um mito de que as raças zebuínas apresentam características reprodutivas mais tardias, porém existem animais tardios e precoces. É necessário e importante identificar e selecionar os mais precoces na maturidade sexual, pois estes começam a vida reprodutiva mais rapidamente, tornando-se mais eficientes e lucrativos (BRITO, 2006). Embora, a precocidade dependa da genética, não se pode desconsiderar o importante papel da nutrição, a qual afeta diretamente o desenvolvimento corporal e, conseqüentemente, o desempenho reprodutivo do animal (BRITO, 2006; BARTH; BRITO; KASTELIC, 2008).

O manejo de suplementação em pastagem é realizado para suprir as deficiências nutricionais dos bovinos, principalmente na época das secas, em que a gramínea já não oferece os nutrientes necessários para os animais ganharem peso e garantirem a reprodução (REIS et al., 2011). A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (AGPs), principalmente o ácido linolênico (n-3) e linoleico (n-6), foi anteriormente proposta para melhorar a eficiência e o desempenho reprodutivo em bovinos (WATHES et al., 2007). Os AGPs são metabolizados pelo organismo e transferidos eficientemente às membranas dos espermatozoides (BRIAN; SURAI; ROOKE, 2003), uma vez que estes ácidos já foram detectados nos espermatozoides

de várias espécies mamíferas, incluindo os ruminantes (POULOS et al, 1986). A importância deste achado reside no fato de que a composição lipídica da membrana espermática é um dos maiores determinantes da motilidade, sensibilidade a processos de criopreservação/descongelação e fatores associados com a viabilidade do sêmen (PETER; RAYMOND, 2001).

Os custos da alimentação representam mais da metade do custo total da produção de bovinos e melhorias na eficiência alimentar são considerações importantes para o crescimento da pecuária (KENNEDY; VAN DER WERF; MEUWISSEN, 1993). Em bovinos de corte, a preocupação para seleção envolvendo a eficiência alimentar só recebeu maior atenção nas últimas duas décadas, devido aos altos custos dos insumos e pelos problemas ambientais na produção animal (HERD et al., 2002). Neste sentido, tem sido dada uma crescente atenção para aumentar a eficiência do rebanho, diminuindo tanto o consumo de alimento quanto os efeitos do impacto ambiental, devido à produção de metano pelos bovinos.

Pesquisas têm sido realizadas para se estudar o consumo alimentar residual (CAR), que tem se revelado uma ferramenta importante a ser utilizada no melhoramento genético de bovinos de corte (MERCADANTE; RAZOOK, 2010). O CAR é calculado como a diferença entre o consumo observado menos o consumo estimado. Dessa forma, animais mais eficientes têm um baixo ou negativo CAR (consumo observado menor do que o predito para o ganho observado) e os menos eficientes têm um alto ou positivo CAR (consumo observado maior do que o predito) (ARTHUR et al., 2001; CREWS, 2005).

Alguns estudos indicaram relação inversa entre os índices de fertilidade e melhoria da eficiência alimentar em bovinos jovens (ARTHUR et al., 2005; BASARAB et al., 2007), tais como pior motilidade espermática em touros jovens com melhor eficiência alimentar (AWDA et al., 2013) e negativa associação entre eficiência alimentar e qualidade do sêmen baseada na morfologia espermática (HAFLA et al., 2012; AWDA et al., 2013). Segundo Wang et al. (2012), houve uma tendência de maior número de touros jovens (um ano de idade) classificados para baixo CAR não atingiram o mínimo desejado para motilidade espermática (60%) em relação a alto CAR.

No entanto, Fox et al. (2004) não relataram diferença no perímetro escrotal (PE), concentração do sêmen, motilidade e anormalidades espermáticas em touros Bonsmara classificados para alto, médio e baixo CAR. Porém, os resultados de estudos que investigaram as relações entre CAR e desempenho reprodutivo ainda são bastante controversos e, portanto, há uma preocupação com animais de maior eficiência alimentar (baixo CAR) em relação à reprodução. Desta forma, é de suma importância estudar os parâmetros reprodutivos de touros da raça Nelore de baixa e alta eficiência alimentar suplementados com ácidos graxos (AGs) em pastagem.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Puberdade e maturidade sexual

A puberdade em machos bovinos é uma característica reprodutiva de grande importância econômica, podendo em programas de melhoramento ser selecionado touros jovens capazes de transferir à sua progênie características como fertilidade, precocidade, capacidade de ganho de peso e musculosidade (FONSECA, 2009).

Puberdade é definida por vários conceitos, como o surgimento da atividade sexual, revelada pela espermatogênese e interesse sexual (VALE FILHO; FONSECA; FRENEAU, 1993; FRENEAU, 1996). O início da puberdade está relacionado com o aparecimento dos primeiros espermatozoides no sêmen. Segundo Wolf, Almquist e Hale (1965), a idade da puberdade é determinada quando o ejaculado apresentar concentração espermática mínima de 50×10^6 espermatozoides/mL e 10% de motilidade (HAMILTON, 2007). A puberdade sofre a influência de fatores: genéticos, ambientais e nutricionais (VÁSQUEZ; VERA; ARANGO, 2003). Segundo Barth e Ominski (2000) e Rawlings et al. (2008), o método de maior acurácia para estimar a puberdade é o PE, a qual apresenta alta correlação com o peso dos testículos, a produção de espermatozoides e a qualidade do sêmen (COULTER; FOOTE, 1979; GREGORY et al., 1991; VÁSQUEZ; VERA; ARANGO, 2003).

A maturidade sexual do touro é alcançada com o crescimento gonadal e corporal e com mudanças quantitativas e qualitativas do sêmen, no qual o ejaculado

deve possuir, no mínimo, 50% de motilidade espermática progressiva, concentração espermática de 1000×10^6 espermatozoides/mL e morfologia espermática com no máximo: 15% de defeitos espermáticos maiores e 30% de defeitos espermáticos totais (LUNSTRA; ECHTERNKAMP, 1982; GARCIA; PINHEIRO; OKUDA, 1987; RAWLINGS et al., 2008). Maturidade sexual é marcada por eventos característicos semelhantes para raças taurinas e zebuínas, porém, o tempo para o aparecimento dessas características são diferentes (GUIMARÃES, 1997).

Nos bovinos, o crescimento das gônadas está associado à secreção de esteróides e o PE apresenta correlação significativa com idade à puberdade e maturidade sexual (LUNSTRA; FORD; ECHTERNKAMP, 1978). Fêmeas de raças cujos touros têm maior PE também são mais precoces e possuem melhores índices de fertilidade (MARTINS FILHO; LÔBO, 1991; MARTIN et al., 1992), sugerindo que medidas testiculares constituem parâmetros que podem auxiliar no processo de melhoria da eficiência reprodutiva dos rebanhos.

Com isso, definimos que a puberdade sexual é o marco inicial do processo reprodutivo, enquanto que a maturidade sexual é a idade em que o animal atinge o seu máximo potencial reprodutivo para realização da cópula e promover a fecundação do oócito (WOLF; ALMQUIST; HALE, 1965; SCHMIDT-HEBBEL, 2000; BRITO et al., 2004a).

2.2 Ultrassonografia testicular

Os testículos são gônadas duplas, de forma ovoide e localização extra-abdominal no interior de uma bolsa escrotal pendulosa. Suas funções são a espermatogênese e a produção de hormônios, como a testosterona (KÖNIG; KIEBICH, 2011; CARVALHO, 2012).

O exame de ultrassonografia do testículo é um método não invasivo, simples e seguro que aliado às avaliações andrológicas pode ajudar no diagnóstico precoce de alterações fisiológicas do órgão avaliado (PECHMAN; EILTS, 1987; SANCHEZ; AFONSO, 2000; JEDRASZCZYK, 2004; JUCÁ et al., 2009; NEPOMUCENO et al., 2013). A ultrassonografia transcutânea é usada para avaliação dos testículos, epidídimos e cordão espermático e pelo acesso transretal é possível examinar as

glândulas vesiculares, ampolas, próstata e bulbouretrais (OLIVEIRA; DIAS; FELICIANO, 2013).

As imagens ultrassonográficas são interpretadas através da ecogenicidade, que é a capacidade que diferentes estruturas têm em refletir ondas do ultrassom gerando ecos, conforme a densidade dos tecidos que constituem os órgãos (SANCHEZ; AFONSO, 2000; NYLAND et al., 2004). As variações são: hiperecoico, imagem de coloração branca e brilhante; hipoecoico, imagem com escala de cinza e com pontos menos brilhantes; e anecoico, imagem com coloração negra (SANCHEZ; AFONSO, 2000; KEALY; MCALLISTER, 2005). A ecotextura é o termo usado para definir o padrão de imagem do tecido, que pode ser homogêneo ou heterogêneo, enquanto o termo isoecoico define quando a ecogenicidade tecidual é a mesma das estruturas adjacentes (NEPOMUCENO et al., 2013). Esses parâmetros das imagens ultrassonográficas são classificados de forma subjetiva pelo especialista, não havendo acurácia na determinação do padrão de ecogenicidade e ecotextura da estrutura investigada. Deste modo, é sugerido o emprego de ferramentas mais precisas na tentativa de diminuir esta subjetividade realizando análises computadorizadas.

Ahmadi et al. (2013) avaliaram características ultrassonográficas dos testículos e descreveram o uso de valores médios de pixels (ecogenicidade), os valores de intensidade de pixel mínimo e máximo e a heterogeneidade de pixel pelo desvio padrão dos valores médios (ecotextura). A metodologia remove a subjetividade da avaliação, tornando-a mais precisa e com maior repetibilidade. Assim, o padrão de pixel das imagens obtidas pelo ultrassom pode apresentar variação em escala cinza de 0 (anecoico, imagem negra) a 255 (hiperecoico, imagem branca).

O parênquima testicular de bovinos é considerado homogêneo e moderadamente ecogênico (PECHMAN; EILTS, 1987; CARDILLI et al., 2010). Além disso, estudos observaram que touros que atingem a puberdade mais precocemente dentro de um rebanho apresentam ecogenicidade hiperecoica quando comparado àqueles mais tardios (CHANDOLIA et al., 1997; ARAVINDAKSHAN et al., 2000; KASTELIC et al., 2001; BRITO et al., 2002; BRITO et al., 2004a; ABDEL-RAZEK; ALI, 2005; CARDILLI et al., 2012).

Segundo Evans et al. (1996) e Ahmad et al. (2011), a ecotextura testicular está diretamente associada à maturidade sexual, além de estar correlacionada com a capacidade espermatogênica do órgão, apresentando associação com a área dos tubulos seminíferos (COULTER; BAILEY, 1988; GÀBOR, 1998). O padrão de pixel para se detectar o desenvolvimento testicular apresenta potencial para revelar mais detalhes do desenvolvimento dos túbulos seminíferos e a espermatogênese (ABDEL-RAZEK; ALI, 2005; GIFFIN; BASTLEWSKI; HAHNEL, 2014). Aravindakshan et al. (2000) avaliaram animais taurinos e concluíram que houve aumento da ecogenicidade do parênquima testicular do nascimento até 4 meses, sendo esse aumento atribuído à proliferação celular. De 4 a 8 meses foi observada diminuição da ecogenicidade do parênquima, a qual foi explicada pelo aumento de volume dos túbulos seminíferos e também da porção fluido/tecido no parênquima testicular. Após 8 meses houve aumento da ecogenicidade, atribuído ao início da divisão das espermatogônias e a formação de maior quantidade de células maduras na espermatogênese.

Novas técnicas ultrassonográficas estão sendo empregadas e aperfeiçoadas para avaliar a integridade vascular do sistema reprodutor dos machos, a exemplo do doppler colorido, "power" e espectral (NEPOMUCENO et al., 2013). Os testículos e o epidídimo são supridos com o sangue da artéria testicular, que se origina da aorta dorsal, ao nível da terceira vértebra lombar (BUDRAS et al., 2007). A ultrassonografia Doppler, associada à bidimensional, pode dar informações em tempo real da arquitetura vascular e dos aspectos hemodinâmicos da artéria testicular (CARVALHO et al., 2008). O Doppler espectral mensura a velocidade do fluxo sanguíneo em função do tempo (DOGRA et al., 2003). As variáveis observadas são: a velocidade de pico sistólico (VPS), a velocidade diastólica final (VDF) e os índices de resistência (IR) e de pulsatilidade (IP), que são calculados por meio da seguinte fórmula: $IR = (VPS - VDF) / VPS$ e $IP = (VPS - VDF) / M$, em que: M representa a média entre VPS e VDF (WOOD et al., 2010). O fluxo normal da artéria testicular apresenta ondas vasculares com picos amplos e contínuos e alta velocidade de fluxo na diástole (CARVALHO, 2004). Alterações tissulares nos testículos induzem ao aumento das velocidades do fluxo sanguíneo (VPS e VDF) e dos índices (IR e IP) (SCHURICH et al., 2009).

2.3 Avaliação andrológica

O exame andrológico é uma avaliação dos fatores que permitem estimar o desempenho reprodutivo dos machos (FONSECA et al., 1997). O procedimento é de fácil realização e de baixo custo, tendo como prática as avaliações clínica, comportamental e a qualidade espermática (OLIVEIRA; SILVA, 2013). Essas avaliações devem fazer parte da rotina e do manejo reprodutivo das propriedades, sendo recomendada na determinação do início da puberdade, na avaliação dos reprodutores antes da estação de monta, nos programas de colheita e conservação de sêmen e nos centros de comercialização dos reprodutores (GOULETSOU; FTHENAKIS, 2010).

A avaliação clínica consiste no exame físico do touro, verificando o estado geral, aparelho locomotor, olhos, temperatura, auscultação digestiva e pulmonar além da idade (SNOWDER et al., 2002; BARBOSA, 2006; ALVES et al., 2006) e o escore de condição corporal (ECC; escala de 0 a 9 para animais extremamente magros e gordos, respectivamente) (WAGNER et al., 1988). Os ECCs extremos prejudicam tanto a libido quanto a qualidade espermática (SARGISON, 2008).

O sistema reprodutor deve ser examinado pela inspeção e palpação dos órgãos genitais externos ou seja, prepúcio, pênis, bolsa escrotal, testículos e epidídimo (BARBOSA, 2006; SARGISON, 2008). O PE e o volume testicular variam com a raça, idade, estado nutricional, estresse e estação do ano (NOAKES; PARKINSON; ENGLAND, 2001). Os órgãos genitais internos (glândulas vesiculares, ampolas, bulbouretrais e próstata) são avaliados através da palpação retal e/ou ultrassonografia em grandes ruminantes (OLIVEIRA; SILVA, 2013; OLIVEIRA; DIAS; FELICIANO, 2013). A avaliação do comportamento sexual é realizada verificando-se a capacidade do macho em detectar as fêmeas em estro e realizar a cópula completa, demonstrando capacidade de serviço (OLIVEIRA; SILVA, 2013; EMBRAPA, 2014).

A avaliação espermática é a parte do exame andrológico que se realiza após a colheita de sêmen, que pode ser feita por eletroejaculação ou por vagina artificial (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; OLIVEIRA; SILVA, 2013). A análise seminal está baseada em técnicas de microscopia, tendo como principais

parâmetros a motilidade, vigor, concentração e morfologia (CRESPILHO et al., 2009). Segundo Saacke (2009) já foi demonstrada a existência de variação individual (efeito touro) quanto ao número de espermatozoides que chegam até o oócito e na qualidade dos embriões produzidos. Portanto, as avaliações que detalham a função do espermatozoide têm sido incorporadas, buscando prever o potencial de fecundação e, em última escala, revelar a fertilidade do macho a partir das amostras de sêmen coletadas (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

O exame andrológico é baseado principalmente nas normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Esses exames de rotina e testes comportamento sexual, associados com desempenho reprodutivo em regime de monta natural, permitem prever com maior confiabilidade o potencial reprodutivo dos machos, possibilitando ao produtor a otimização do uso de seus reprodutores (MARTINS, 2001).

2.4 Criopreservação espermática

A criopreservação do sêmen contribui para expansão das técnicas reprodutivas como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE) e a fecundação *in vitro* (FIV). No entanto, o processo de criopreservação espermática e posterior descongelamento podem afetar a motilidade, reduzindo a sobrevivência e a capacidade de fecundação do espermatozoide, além de ocasionar alterações metabólicas que, em conjunto, comprometem a fertilidade (NAIR et al., 2006; BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Com isso, é muito importante serem utilizados meios de criopreservação em que o mínimo de espermatozoides sejam lesionados, permitindo a preservação da motilidade e da integridade da membrana plasmática, protegendo-os contra o choque térmico, mantendo o equilíbrio eletrolítico e a pressão osmótica (PICKETT; AMANN, 1993; ENGLAND, 1993; MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Além dos meios diluidores, o sêmen no processo de criopreservação sofre influência de outros fatores, tais como crioprotetores e curvas de refrigeração e criopreservação (FORERO-GONZALEZ et al., 2012).

Os meios de criopreservação espermática são compostos por substâncias iônicas e não iônicas responsáveis pela conservação da osmolaridade e

tamponamento, por fontes de lipoproteínas necessárias para a prevenção do choque térmico, por crioprotetores como glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO), por fontes de energia apresentadas por açúcares, como glicose e frutose, e por antibióticos, enzimas e detergentes (VISHWANATH; SHANNON, 2000). As substâncias diluidoras mais utilizadas como agente protetores aos processos de refrigeração e criopreservação são: gema de ovo, leite desnatado e glicerol (SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015).

A curva de refrigeração é uma das principais etapas do processo de criopreservação, sendo muito importante para reduzir o metabolismo das células espermáticas (MAZUR, 1984; SALAMON; MAXWELL, 2000). No entanto, mudanças irreversíveis na membrana celular dos espermatozoides começam de maneira geral entre 20°C e 5°C (QUINN et al., 1980; WATSON, 1995). Nesta fase, a membrana plasmática passa do estágio líquido para o estágio cristalino (gel), podendo causar ruptura e perdas de seus arranjos celulares (AMANN; PICKETT, 1987; HOLT, 2000; SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015). Se o espermatozoide não for refrigerado apropriadamente, ele sofrerá danos que poderão resultar em perda da motilidade, viabilidade e capacidade fecundante (WATSON, 1995; HOLT, 2000). Segundo Leite et al. (2010), a curva de refrigeração de 0,25°C/min e tempo de equilíbrio de 4 horas de duração foi melhor para motilidade total e progressiva e apresentou menos danos à membrana plasmática e acrossomal.

No processo de criopreservação, os espermatozoides devem ser submetidos à refrigeração moderada e controlada, diminuindo a possibilidade de perda da viabilidade celular, por minimizar a possibilidade de formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (KUMAR; MILLAR; WATSON, 2003). Quando a curva de criopreservação é lenta ocorre a desidratação das células, evitando a formação de cristais de gelo intracelular, no entanto, a alta concentração de solutos pode causar danos às células. Na curva rápida, não há tempo para ocorrer a desidratação e a concentração dos meios extra e intracelular são semelhantes, levando a formação de cristais de gelo intracelulares, que geram estresse osmótico e danos aos espermatozoides (WATSON, 2000; LEITE et al., 2011; SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015). Com isso, a velocidade da criopreservação deve ser lenta o bastante para evitar a formação de cristais de gelo intracelular, porém rápida o

bastante para evitar os danos causados pela exposição prolongada às altas concentrações de soluto (HOLT, 2000).

Assim, como a fase de criopreservação, a descongelação é muito importante para a sobrevivência dos espermatozoides. Este processo causa passagens rápidas de água para o interior das células que se não for conduzida de maneira correta pode causar rompimento das membranas (WATSON, 1995; HOLT, 2000). O protocolo de descongelação preconizado para bovinos é a manipulação das palhetas de 0,25 e 0,5 mL em temperatura de 35 a 37°C, por 20 a 30 segundos (ASBIA 2017).

Para obtenção de melhor acurácia na predição da fertilidade do sêmen criopreservado é necessário uma associação de testes complementares *in vitro* (SIKKA, 1996; SILVA, 2000; BUENO, 2000). Dentre esses testes, pode-se incluir os que avaliam as características do movimento espermático, potencial de membrana mitocondrial, a integridade da membrana plasmática e acrossomal, a capacidade de penetração no muco cervical, reação acrossomal, o reconhecimento da zona pelúcida, a fusão espermatozoide e oócito, o grau de estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide e a integridade do seu DNA. O teste de fertilização *in vitro* possui maior correlação com a fertilidade (WHITFIELD; PARKINSON, 1995), no entanto, o melhor método é a taxa de prenhez após IA (ZHANG et al., 1999).

2.5 Análise computadorizada de avaliação espermática

As técnicas computadorizadas de avaliação espermática fornecem informações de parâmetros cinéticos de uma amostra de sêmen com base na avaliação individual das células e com avaliação detalhada das variáveis, o que não é possível através da análise convencional subjetiva (MOSES et al., 1995; JANUSKAUSKA; ZILINSKAS, 2002).

A técnica de CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) utiliza um software que analisa e salva as informações relativas a várias características da cinética espermática. A motilidade total (MT, %) é representada pela soma de todas as células móveis, a motilidade progressiva (MP, %) representa a porcentagem de células com movimento progressivo, a velocidade rápida (RAP, %) é a porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos. A velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) é

a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula. A velocidade em linha reta ou linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) é a distância considerando uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória dividida pelo tempo decorrido. A velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula. Esta é sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade (CONTRI et al., 2010).

A amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) é a amplitude de deslocamento médio da cabeça do espermatozoide durante deslocamento. A mensuração da ALH está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito. A frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF, Hz) é determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção. A progressividade ou retilinearidade (STR, %) é a relação percentual entre VSL e VAP, sendo calculada pela equação $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta. A linearidade (LIN, %) é a relação percentual entre VSL e VCL, sendo calculada pela equação $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$. Esta é a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (MATOS et al., 2008; BERGSTEIN; WEISS; BICUDO 2014). A avaliação das características seminais através da técnica CASA melhora a objetividade e precisão das análises (KRAUSE, 1995; GIL et al., 2000).

2.6 Citometria de fluxo

A técnica da citometria de fluxo possibilita a contagem, classificação e isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com corante fluorescente específico, são individualmente movidas por meio de um sistema de detector óptico em fluxo laminar e, então são contadas (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009). Com esta técnica pode-se avaliar muitos parâmetros da célula espermática, como: estrutura da cromatina, integridade das membranas plasmática, status acrossomal, viabilidade espermática, função mitocondrial e apoptose (GRAHAM et al., 1990; THOMAS et al., 1998; FERRARA et al., 1997; LOVE, 2005).

A avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide é muito importante para os processos relacionados a fertilização, como a capacitação

espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA; GABALDI; WOLF, 2000). As sondas fluorescentes mais utilizadas para avaliação da viabilidade da membrana espermática são as de iodeto de propídio (PI) e etídio homodímero (EH). Esses corantes ao entrarem nas células com a membrana plasmática danificada emitem fluorescência vermelha quando há ligação de ácidos nucleicos (PI: 636 nm; EH: 617 nm) (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

Para a determinação da integridade acrossomal tem-se utilizados combinações de sondas fluorescentes, como a isotiocionato de fluoresceína (FITC) associado a aglutininas como a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA), os quais apresentam capacidade de ligação a glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (ARRUDA et al., 2005). Segundo Rodriguez-Martinez. (2003), o número de espermatozoides viáveis expressos por meio da integridade da membrana plasmática e acrossomal correlaciona-se positivamente com os índices de fertilidade.

2.7 Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)

O processo de PIVE compreende três etapas desenvolvidas no laboratório: a maturação oocitária *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) até os estádios de mórula ou blastocisto, quando poderão ser transferidos para receptoras ou criopreservados. Para a obtenção de melhores resultados com a técnica, muitos estudos têm sido realizados visando avaliar individualmente cada uma das três etapas, procurando ajustar da melhor maneira possível todas as variáveis envolvidas no processo (MOHAN et al., 2002).

A MIV é determinada como a retomada da meiose, formação do primeiro corpúsculo polar e de outras alterações nucleares e citoplasmáticas. O tempo da maturação é de 24 horas na maioria dos processos (GORDON, 1994; CHA; CHIAN, 1998).

A fecundação *in vitro* é ilustrada pela capacidade dos espermatozoides de ligarem a zona pelúcida dos oócitos e de fecundá-los. O êxito da FIV em bovinos requer preparação apropriada tanto para o sêmen quanto para o oócito, bem como condições que favoreçam a atividade metabólica dos gametas feminino e masculino (BRACKETT, 1981). Para que ocorra a fecundação dos oócitos, os espermatozoides

precisam sofrer, previamente, um processo chamado de capacitação (MATÁS et al., 2010). A capacitação espermática envolve múltiplas etapas, dentre elas a modificação das características da membrana, atividade enzimática e motilidade dos espermatozoides (GURAYA, 2000). Assim, os espermatozoides ficam hiperativados e se unem as proteínas específicas da zona pelúcida dos oócitos de maneira a induzir a reação acrossômica (FLORMAN; FIRST, 1988).

Na preparação dos espermatozoides para a FIV, é necessário que os vivos sejam separados do plasma seminal, crioprotetores e das células mortas (COELHO et al., 2000). Com a finalidade de promover separação espermática, os métodos mais utilizados é a centrifugação em gradiente de Percoll (GALLI; LAZZARI, 1996) e a técnica do sedimento - “swim up” (PARRISH et al., 1984).

O CIV de embriões é definido como o desenvolvimento do estágio inicial embrionário até a fase de blastocisto (SREENAN; SCANLON, 1968), este processo leva em média 7 dias após a FIV, depois é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para a transferência ou criopreservação (MINGOTI, 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

2.8 Nutrição na reprodução de bovinos

Os parâmetros reprodutivos dos zebuínos e a intensa seleção genética para peso pós-desmama são informações importantes para o delineamento de programas de seleção para estas raças, visando a melhoria dos índices reprodutivos e, conseqüentemente, aumento de produção de carne (RAZOOK; MERCADANTE, 2007). Vários estudos destacaram os ganhos genéticos alcançados nas características de crescimento nos rebanhos Nelore (RAZOOK et al., 1998; MERCADANTE et al., 2003; MERCADANTE; RAZOOK, 2010). Porém, poucos estudos foram feitos para avaliar o impacto da seleção genética para eficiência alimentar na reprodução das raças zebuínas.

Nas condições tropicais, a deficiência nutricional é bastante comum em bovinos mantidos a pasto, principalmente na época seca do ano, quando as pastagens apresentam queda na disponibilidade da forragem e baixo valor nutritivo. O consumo insuficiente de energia é provavelmente o principal fator nutricional que tem influência sobre a fertilidade, retardando o início da produção espermática e a

maturidade sexual do macho (NOLAN et al., 1990; KASTELIC, 2014; CUNHA et al., 2015). A subnutrição altera a funcionalidade do testículo, afetando o mecanismo endócrino, assim diminuindo a secreção do LH (hormônio luteinizante) e a resposta da testosterona ao GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Não há efeito da nutrição sobre a libido, porém no período de seca, quando a subnutrição é grave, este estado afeta fisicamente o animal (COSTA E SILVA, 2002).

Segundo Reis et al. (2011), a suplementação alimentar para bovinos em pastejo constitui importante procedimento para corrigir desequilíbrios nutricionais da pastagem, uma vez que a adição dos nutrientes limitantes no sistema de pastejo, via suplemento, permite o crescimento contínuo dos animais e redução no ciclo de produção, além de servir como veículo para inclusão de aditivos e ácidos graxos.

2.9 Consumo alimentar residual (CAR) e características reprodutivas em touros

Os custos da alimentação representam cerca de 70 a 90% dos custos totais da produção de bovinos, dependendo da fase de criação e do nível de produção desejado (FORBES, 2007). Assim, a melhoria na eficiência alimentar é uma condição importante em programas de melhoramento (KENNEDY et al., 1993). Segundo Koch et al. (1963), o CAR é um importante indicador de eficiência alimentar, que é uma relação do consumo alimentar para o peso do animal (manutenção) e o ganho de peso (produção) (CREWS, 2005; MERCADANTE; GRION, 2013; BERRY; CROWLEY, 2013).

Herd, Oddy e Richardson (2004) evidenciaram que animais com avaliação genética favorável para CAR (baixo CAR), em confinamento, produziram progênie com eficiência alimentar 41% mais alta a pasto e 26% menor para CAR. Este trabalho confirma que o uso de touros com avaliações genéticas favoráveis para CAR traz benefícios econômicos para sistemas de produção de carne bovina a pasto. Arthur e Herd (2008) relataram que a seleção de animais classificados para baixo CAR pode resultar em progênie que consomem menos alimento sem prejuízos no desempenho animal.

Pesquisas recentes apresentaram relação inversa entre medidas relativas a fertilidade e melhor eficiência alimentar em touros jovens. Awda et al. (2013) e Wang

et al. (2012) observaram melhor motilidade e motilidade progressiva em espermatozoides de touros jovens de menor eficiência alimentar, enquanto que Hafla et al. (2012) observaram associação negativa entre a eficiência alimentar e a qualidade do sêmen baseada na morfologia espermática. Já Arthur et al. (2001) e Schenkel, Miller e Wilton (2004) não observaram correlação negativa entre seleção para CAR e PE. Fox et al. (2004) não observaram diferença no PE, na concentração espermática, na motilidade e nas anomalias dos espermatozoides de touros classificados para alto e baixo CAR.

Com isso, há uma preocupação com touros de maior eficiência alimentar em relação à fertilidade e desempenho reprodutivo, já que a idade à puberdade e maturidade sexual de machos jovens é de grande importância sobre a eficiência produtiva, reprodutiva e econômica bovina (NOGUEIRA, 2004).

2.10 Suplementação com ácidos graxos (AGs) na qualidade seminal de bovinos

Diversas fontes lipídicas, como soja, grãos de girassol, amendoim, óleos de peixes, linhaça e outros óleos, são ricas em AGs e podem ser incluídas na dieta de ruminantes. Apesar dos vários benefícios que podem ser adquiridos pelos bovinos com a inclusão de AGs na dieta, estes lipídeos ao entrarem no rúmen são rapidamente hidrolisados a AGs e glicerol. O glicerol é usado como fonte de energia pelas bactérias ruminais e os AGs são bio-hidrogenados ou neutralizados na forma de sabões de cálcio (VAN SOEST, 1994; PALMQUIST; MATOS, 2011).

Para prevenir parcialmente os processos de bio-hidrogenação do rúmen os AGs dietéticos são fornecidos na forma protegida, sendo liberados apenas no intestino, para logo serem absorvidos pelo organismo (PÉREZ, 2005). Este tipo de AGs protegido, rico em ácidos linoleico e linolênico, é um produto altamente estável em água e alta temperatura e somente é digerido no organismo do animal em meio ácido (NRC, 2007). Como o pH no rúmen é em torno de 6,2, os AGs protegidos permanecem inalterados. Chegando ao abomaso, cujo meio é extremamente ácido (pH = 2 e 3), ocorre a liberação dos AGs e íons de cálcio para o intestino, que serão absorvidos e levados pela corrente sanguínea (JENKINS; PALMQUIST, 1984; SARTORI; MOLLO, 2007).

O nível energético na dieta tem sido um dos aspectos mais estudados na influência da nutrição sobre a reprodução (BARTH; BRITO; KASTELIC, 2008). Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs), principalmente o ácido linolênico (n-3) e linoleico (n-6) têm apresentado importante efeito na performance reprodutiva de bovinos, tanto fêmeas como em machos (WATHES et al., 2007). Estes AGs já foram detectados nos espermatozoides de várias espécies mamíferas, incluindo os ruminantes (POULOS et al., 1986). Desta forma, espera-se que os AGs possam melhorar as características dos espermatozoides, contribuindo na eficiência reprodutiva do macho bovino.

Segundo Selvaraju et al. (2012), os AGPs (n-3 e n-6) podem aumentar a fluidez da membrana plasmática, ajudando na resistência a lesões decorrentes da formação de cristais de gelo durante os processos de criopreservação e descongelamento. Além disso, estão envolvidos na capacitação espermática e na interação entre o espermatozoide com a superfície uterina (STRZEZEK et al., 2004; DOLATPANAH et al., 2008) e oocitária (WATHES et al., 2007).

Gholami et al. (2010) observaram melhora na qualidade do sêmen de touros holandeses alimentados com dieta rica em óleo de peixe (n-3), com aumento na cinética, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática. Dietas lipídicas enriquecidas com AGPs (n-3 e n-6) resultaram em diferenças nas proporções de n-6 e n-3 nos espermatozoides e no plasma seminal podendo modificar a estrutura e fluidez, influenciando na qualidade do sêmen (DOLATPANAH et al., 2008; SAMADIAN et al., 2010).

2.11 Concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios relacionados à eficiência alimentar e suplementação com AGs

A determinação e quantificação do perfil sanguíneo dos animais é uma ferramenta utilizada para avaliação nutricional de um rebanho, a fim de identificar índices produtivos e reprodutivos, bem como diagnosticar doenças metabólicas (PEIXOTO; OSORIO, 2007). As maiores dificuldades da utilização desta ferramenta é a sua interpretação, devido à falta de valores de referência adequados, pois estes alteram de acordo com a idade do animal, raça, estado fisiológico, gênero, clima e alimentação (BEZERRA, 2006). O conhecimento da fisiologia e bioquímica do

animal é de suma importância para compreender o perfil metabólico sanguíneo e os métodos para sua determinação (WITTEWER, 1995; PEIXOTO; OSÓRIO, 2007).

Segundo Archer et al. (2002), a compreensão dos processos responsáveis pela variação observada em eficiência alimentar é importante, primeiramente, na predição de possíveis respostas correlacionadas à seleção. Os principais mecanismos fisiológicos que influenciam a variação no CAR estão relacionados às exigências de manutenção, transporte de íons, metabolismo dos tecidos e incremento calórico (BASARAB et al., 2003; RICHARDSON et al., 2004).

Richardson et al. (2004) avaliaram os processos metabólicos que contribuem para a variação no CAR e detectaram, em animais com alto CAR, maiores níveis de insulina, cortisol e ureia e menores níveis de triglicerídeos, sendo sugerido que respostas sejam relacionadas à mudanças na composição corporal, reciclagem tecidual e eficiência de uso de nutrientes devido a seleção divergente para CAR.

A glicose é um elemento importante para determinar perfil metabólico de gado de corte, pois em condições de campo pode ser observado hipoglicemia quando o animal apresentar balanço de energia severamente negativo (PAYNE, 1987). A insulina é um hormônio que influencia a regulação da concentração de glicose em circulação, estando diretamente envolvida com o crescimento celular no desenvolvimento dos animais (FOULADI-NASHTA; CAMPBELL, 2006). A insulina é um hormônio anabólico, produzido pelo pâncreas em resposta a alterações dos níveis plasmáticos de glicose (VOLP; REZENDE; ALFENAS, 2008). Nos músculos e tecido adiposo a insulina promove, respectivamente, a captação e armazenamento de glicose em forma de glicogênio e diminui a liberação de AGs livres. Desta forma, afeta a lipólise e a lipogênese, minimizando a oxidação e estimulando a deposição de gorduras (CUNNINGHAM, 2004). Além disso, atua no hipotálamo, influenciando no mecanismo da fome e saciedade (CUNNINGHAM, 2004; VOLP; REZENDE; ALFENAS, 2008).

Nos espermatozoides, a insulina está presente na diferenciação das espermatogônias em espermatócito primário pela ligação com os receptores de IGF-I, além de ajudar no metabolismo espermático (NAKAYAMA et al., 1999), pois a energia utilizada pelo espermatozoide para iniciar os processos catabólicos, manter

a motilidade, o balanço iônico e as demais funções celulares vem através da glicólise (VAN TILBURG et al., 2008).

A leptina é um hormônio regulador do metabolismo energético que desempenha um papel-chave na regulação, ingestão e no gasto energético. Este hormônio é produzido principalmente pelo tecido adiposo e é responsável pelo controle da ingestão alimentar (ZIEBA; AMSTALDEN; WILLIAMS, 2005; ROMERO; ZANESCO, 2006). Além disso, a leptina tem papel importante no crescimento e reprodução (BRADFORD et al., 2006). Assim, baixas concentrações de leptina plasmática estão diretamente ligadas à desregulação do sistema reprodutor (MEIRA; MORAES; BOHME, 2009).

Kelly et al. (2009) analisaram o plasma sanguíneo de novilhas cruzadas Limousin e Holandês, e encontraram correlações significativas entre CAR e as concentrações sanguíneas de leptina, AGs não esterificados, β -hidroxibutirato e relação glicose:insulina, concluindo que os processos biológicos do animal podem ser responsáveis pela variação da eficiência alimentar. Bellin et al. (1998) ressaltaram a importância das concentrações séricas de leptina sobre a qualidade da célula espermática.

A suplementação com AGs para bovinos aumenta a concentração plasmática de colesterol (WILLIAMS, 1989; HIGHTSHOE et al., 1991), beneficiando o desempenho reprodutivo, visto que o colesterol é um componente essencial das membranas celulares dos mamíferos e importante para a síntese da testosterona, por uma seqüência de cadeias enzimáticas dentro das células de Leydig (KNOBIL; NEILL, 1988; CHRISTIE, 1989). A maioria do colesterol plasmático é transportada por lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade (GRUMMER; CARROL, 1991). Mihm e Austin (2002) e Ghoreishi et al. (2007) observaram que a adição de AGs na dieta de ruminantes aumenta o nível de colesterol plasmático ligado ao HDL.

A testosterona é um andrógeno produzido pelas células de Leydig e tem a função de estimular os estágios finais da espermatogênese, prolongar a vida do espermatozoide no epidídimo, promover o crescimento, desenvolvimento e atividade secretória das glândulas sexuais acessórias dos machos e manter as características sexuais secundárias, além de comportamento sexual ou libido do macho (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Este hormônio é o andrógeno mais importante produzido pela

gônada masculina e apresenta correlação positiva com o crescimento testicular (RAWLINGS; HAFS; SWANSON, 1972; MOURA; RODRIGUES; FILHO, 2002).

Vários estudos revelaram que a baixa qualidade espermática está associada à deficiência de testosterona circulante (SCHALLENBERGER et al., 1991, GULIA et al., 2010). Brito et al. (2007) e Dance et al. (2015) relataram que dietas de diferentes níveis de energia para touros influenciaram nas concentrações de testosterona plasmática. Martin, Tjondronegoro e Blackberry (1994) observaram maiores concentrações de testosterona com dietas contendo alto índice energético para carneiros.

3. Hipóteses

Touros jovens da raça Nelore suplementados com AGs protegido por 10 meses (14 aos 24 meses de idade) em regime de pastagem apresentam melhores características seminais do que animais alimentados com suplementação sem adição de AGs.

Animais de baixo CAR são mais tardios nas características reprodutivas quando comparados aos animais de alto CAR.

Touros com maior eficiência alimentar e suplementados com AGs protegido dos 14 aos 24 meses de idade apresentam melhor desempenho reprodutivas.

4. Objetivos

4.1 Geral

Avaliar os parametros reprodutivos de machos jovens da raça Nelore de baixa e alta eficiência alimentar suplementados com ácidos graxos protegidos em regime de pastagem.

4.2 Específicos

Avaliar as características de crescimento, consumo alimentar a pasto, concentrações sanguíneas de hormônios e metabólitos, ultrassonografia testicular, qualidade do sêmen fresco e criopreservado, fecundidade oocitária do sêmen avaliado pela técnica de PIVE de touros jovens da raça Nelore, classificados para CAR e suplementados com AGs protegido (14 aos 24 meses de idade) em regime de pastagem.

5. Material e Métodos

Os procedimentos de cuidado e manuseio dos animais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Câmpus Jaboticabal (Protocolo no 017361/13).

5.1 Local e animais

O experimento foi realizado no Centro Avançado de Pesquisa em Bovinos de Corte de Sertãozinho - SP, pertencente ao Instituto de Zootecnia/APTA/SAA. As atividades laboratoriais foram realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Câmpus de Jaboticabal, SP, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Câmpus de Botucatu, SP e na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Câmpus de Araçatuba, SP. O experimento foi realizado por dois anos consecutivos, de dezembro de 2014 a outubro de 2016 (1º ano: dezembro/2014 à outubro/2015; 2º ano: dezembro/2015 à outubro/2016).

Os touros utilizados no experimento foram provenientes de uma das linhas seleção do Instituto de Zootecnia (IZ), cujos animais foram pré selecionados dentro de rebanho com base em maiores pesos aos 378 dias de idade (P378) e consumo alimentar residual (CAR), obtidos ao final da prova de desempenho em confinamento, em um esquema denominado de seleção direcional. Na pré seleção os animais foram desmamados aos sete meses de idade e permaneceram em teste

de desempenho em confinamento para determinação do CAR e do P378. Os touros jovens, cerca de $57,0 \pm 2,8$ por ano, receberam alimentação em baia coletiva com cochos eletrônicos para registro do consumo alimentar (GrowSafe® Systems Ltd., Airdrie, Alberta, Canadá), por 21 dias para adaptação, seguidos de 100 dias para registros do consumo alimentar individual e cálculo do CAR, e mais 47 dias para obtenção do P378. Nesse período os animais foram pesados, sem jejum, a cada 28 dias (MERCADANTE; RAZOOK, 2010; FIDELIS et al., 2017).

O CAR foi calculado como o termo de erro da equação, conforme modelo proposto por Koch et al. (1963):

$$\text{CMS} = \beta_0 + \beta_P \cdot \text{PC}^{0.75} + \beta_G \cdot \text{GMD} + \varepsilon(\text{CAR})$$

onde: CMS é o consumo de matéria seca observado durante o teste, β_0 é a intercepção da equação, $\text{PC}^{0.75}$ é o peso corporal metabólico médio do teste, GMD é o ganho de peso médio diário durante o teste e β_P e β_G são os coeficientes de regressão de $\text{PC}^{0.75}$ e GMD, respectivamente e ε = resíduo da equação.

Ao final do teste de desempenho, os animais foram classificados em baixo CAR ($<$ média - 0,5 DP (desvio padrão)), médio CAR (\pm 0,5 DP da média) e alto CAR ($>$ média + 0,5 DP), dentro de ano. A amostragem dos 48 machos, nascidos em 2013 e 2014 (24 animais por ano), foi feita dentro das classes extremas de CAR, sendo 24 animais baixo CAR (negativo) e 24 alto CAR (positivo), apresentando valores médios de $-0,86 \pm 0,08$ e $0,73 \pm 0,08$ respectivamente. Os animais apresentavam no início do experimento $14,3 \pm 0,13$ meses de idade e peso corporal $389,5 \pm 5,43$ kg e atingiram no término do experimento $24,6 \pm 0,13$ meses de idade com $521,1 \pm 6,09$ kg de peso corporal.

5.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2 (CAR x Suplementação) com medidas repetidas no tempo (avaliação a cada 28 dias). Após a amostragem, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: com suplementação de AGs protegido e com suplementação controle (sem AGs protegido; Figura 1). O experimento foi composto por quatro tratamentos, sendo: baixo CAR com e sem suplementação com AGs, e alto CAR com e sem suplementação com AGs, totalizando 48 animais (6 animais por tratamento por ano).

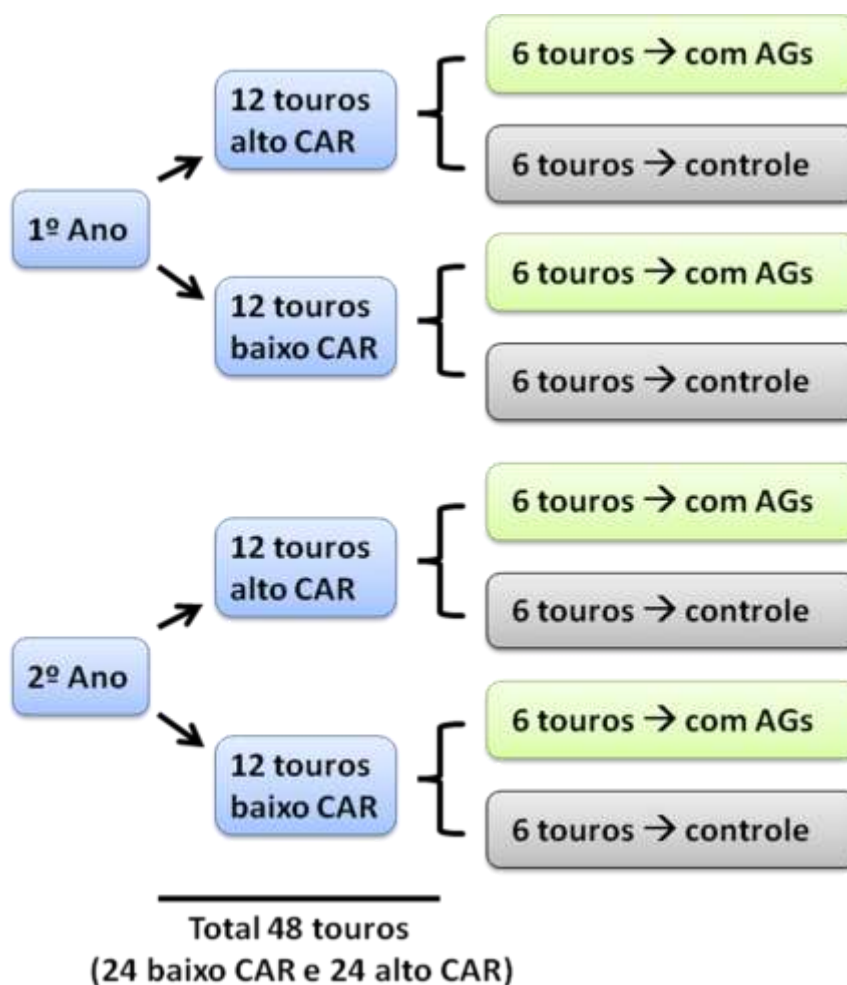


Figura 1. Delineamento experimental mostrando a divisão dos grupos de acordo com os tratamentos e ano.

Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, com lotação contínua e taxa de lotação fixa, distribuídos em dois piquetes de 6 ha de área, cada uma com taxa de lotação inicial de 1,7UA/ha (2 animais/ha). Os animais de um piquete receberam a suplementação com AGs protegido (1 kg/animal/dia), sendo que neste local permaneceram 12 animais por ano (6 baixo CAR e 6 alto CAR). No outro piquete os animais receberam a suplementação controle, sem AGs (1,25 kg/animal/dia) e neste local permaneceram 12 animais por ano (6 baixo CAR e 6 alto CAR). Os suplementos foram formulados inicialmente para atender as exigências nutricionais de bovinos jovens em crescimento (NRC, 2000; nível 2), de acordo com o teor de nutrientes da pastagem, e para serem isoproteicos. Para isso, os animais do tratamento controle receberam 0,25 kg de suplemento/dia a mais do

que os animais do tratamento com AGs. Os mesmos foram fornecidos na mesma quantidade durante todo o ano. Os piquetes foram equipados com cocho coletivo coberto (comprimento 180 cm x largura 60 cm) para fornecimento do suplemento no período da manhã (Figura 2) e bebedouros e cocho para fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.



Figura 2. Cochos para suplementação em cada piquete.

A composição dos ingredientes e nutrientes de cada suplemento estão apresentados na Tabela 1.

A fonte de AGs foi o Megalac-E® (200 g/animal/dia; Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, Brasil) (HERNÁNDEZ et al., 2012) que, de acordo com descrição do fabricante, é uma gordura protegida da degradação ruminal. Este suplemento é fabricado a partir de óleo de soja e passa por um processo de saponificação, formando sais de cálcio de AGs.

Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição química dos suplementos fornecidos para machos jovens da raça Nelore.

Ingredientes (%)	Suplementos*	
	AGs	Controle
Farelo de milho	43	78
Farelo de soja	34	19
Mineral ¹	3	3
Megalac-E ²	20	0
Composição Química ³		
MS (%)	87,76	85,37
MM (%MS)	4,95	1,97
PB (%MS)	21,90	18,32
EE (%MS)	19,81	4,49
FDN (%MS)	10,72	12,45
FDA (%MS)	4,44	4,75
Lignina (%MS)	0,68	0,78
FDNi (%MS)	14,50	6,86
NDT (%MS)	99,08	77,83
Perfil dos ácidos graxos (%)		
Palmítico (C16:1)	12,97	11,82
Estearico (C18:0)	3,61	3,20
Oleico (C18:1n9c)	28,30	34,55
Linoleico (C18:2n6c)	44,00	42,27
γ Linolenico (C18:3n6)	0,02	1,40
α Linolenico (C18:3n3)	3,06	1,75
Outros ⁴	8,04	5,01

* Foram fornecidos 250g a mais de suplemento/animal/dia ao grupo Controle com objetivo de fornecer dietas isotrópicas para ambos os tratamentos (NRC, 2000; nível 2). ¹ Composição/kg: Fósforo (min), 8%; Cálcio (min e máx), 15% a 17%; Sódio (min), 14,5%; Enxofre (min), 1,2%; Cobalto (min), 0,0021%; Cobre (min), 0,016%; Iodo (min), 0,0018%; Manganês (min), 0,014%; Selênio (min), 0,00027%; Zinco (min), 0,045%; Níquel (min), 0,00011%; Flúor (min), 0,008%. ² Composição Megalac (Nível de garantia) = Extrato Etéreo, min 850g/kg; Cálcio, min 75g/kg - máx 125 g/kg; Umidade, máx 50g/kg; Matéria Mineral, máx 200g/kg; Energia Metabólica (Baseada no NRC, 2000), mín 6300 kcal/kg; Ácido Linoleico (n-6), min 350 g/kg; Ácido Linolênico (n-3), min 20 g/kg. ³ MS = Matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = fibra insolúvel em detergente ácido; Lignina; FDNi = fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; NDT = nutrientes digestíveis totais, estimado de acordo com Detmann, Valadares Filho e Paulino (2010). ⁴ Outros ácidos graxos: cáprico (C10:0); laurico (C12:0); mirístico (C14); miristoleico (C14:1); pentadecanoico (C15:0); palmitoleico (C16:1); heptadecenoico (C17:0); heptadecenoico (C17:1); cis-vacênico (C18:1n7); araquídico (C20:0); eicosenoico (C20:1n9); behênico (C22:0); erúcico (C22:1n9); tricosanóico (C23:0); lignocérico (C24:0).

5.3 Avaliações da pastagem e dados climáticos

As amostragens da forragem foram realizadas quatro vezes no ano: fevereiro, maio, julho e outubro, representando as estações do ano (verão, outono, inverno e primavera, respectivamente) que influenciam o crescimento e a qualidade das pastagens tropicais. Foram avaliados a altura do dossel, produção de massa seca de forragem e a técnica de pastejo simulado. A altura média do dossel forrageiro foi determinada através de régua graduada em centímetros com medição de 80 pontos aleatórios por piquetes. A produção de massa seca de forragem foi realizada através do método do quadrado, e cinco amostras por piquete, na altura média do dossel, foram coletadas (MACMENIMAN, 1997). O corte foi rente ao solo, utilizando um quadrado de área de 1m². Estas amostras foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a aproximadamente 65°C por 72 horas e moídas em moinho de facas tipo Willey.

Na determinação da composição química da dieta, foram amostrado os ingredientes do suplemento e o pasto. Para a pastagem foi realizada a técnica de pastejo simulado (JOHNSON, 1978). Primeiramente foi observado o comportamento de pastejo dos animais, como a área, altura e partes das plantas que estavam sendo consumidas. As amostras de pastejo simulado foram colhidas pelo mesmo observador, manualmente, na tentativa de se obter uma porção da planta similar àquela selecionada pelos animais. Os piquetes foram roçados e adubados (30 kg/ha de nitrogênio) após a retirada dos animais do 1º ano (outubro/2015) para a entrada de outros animais do 2º ano (dezembro de 2015).

Após secagem e moagem das amostras do pastejo simulado essas foram avaliadas quanto aos teores de matéria seca (MS; método oficial 934.01), matéria mineral (MM; método oficial 942.05) e extrato etéreo ácido (EE; método oficial 954.02) de acordo com recomendações da Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 1995). A proteína bruta (PB) foi determinada pelo método de combustão de Dumas, utilizando o equipamento Leco®, modelo FP-528 (Leco Corporation, Michigan, USA). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados pelos métodos propostos por Van Soest, Robertson e Lewis (1991) utilizando o equipamento ANKOM Fiber Analyzer (ANKOM® 2000 Technology Corporation, USA). As correções em relação aos teores

de cinzas e proteína contidos na FDN e FDA foram efetuadas conforme recomendações de Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente. A lignina foi estimada conforme método Klason descrito por Van Soest e Robertson (1985). A extração de ácidos graxos (AGs) nos alimentos foi realizada de acordo com o método de Folch et al. (1957) e a metilação de acordo com Kramer et al. (1997).

O perfil de AGs foi quantificado por cromatografia gasosa (CG-14B, Shimadzu, Japão) com vazão do gás de arraste (H_2) de 1 mL/min. O padrão de ácidos graxos foi da Sigma: n.º. cat 189-19 e 47015-U. O método utilizado para extração de AGs totais foi exposto por Bligh e Dyer (1959).

Os dados de temperatura e de precipitação pluviométrica dos anos 2015 e 2016 foram adquiridos de acordo com o Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2017) localizado no Instituto de Zootecnia/APTA/SAA de Sertãozinho - SP (Latitude $21^{\circ}8'16''$ sul, longitude $48^{\circ}58'22''$ oeste e altitude de 579 metros).

5.4 Avaliações de consumo alimentar

Para estimar o consumo alimentar individual dos animais foi utilizado o indicador externo óxido de cromo (Cr_2O_3) e o indicador interno FDNi (fibra em detergente neutro indigestível). O Cr_2O_3 foi utilizado para estimar o volume da excreção fecal e o FDNi para estimar o consumo da pastagem de capim-marandu.

O óxido de cromo foi fornecido para os animais durante 9 dias consecutivos no mesmo horário (8:00 h), sendo sete dias de adaptação. No oitavo (8:30h), nono (12:30h) e décimo dias (16:30h) foram feitas as coletas de fezes (TITGEMEYER; ARMENDARIZ; BINDEL, 2001; DETMANN et al., 2001). Este processo foi realizado nos meses de fevereiro, maio, julho e outubro de cada ano. O Cr_2O_3 , foi fornecido em um papelote contendo 10g, foi introduzido diariamente via esôfago em cada animal, com o auxílio de um aplicador de PVC (SMITH; REID, 1955).

As amostras de fezes foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada à aproximadamente $65^{\circ}C$ por 72 horas e moídas em moinho de facas tipo Willey (2mm). As amostras referentes aos diferentes horários de coleta foram compostas em uma única amostra por animal (amostra composta) em cada mês avaliado e foram submetidas às análises químicas. Nestas amostras foram realizados ensaios

de digestão para a recuperação fecal do Cr_2O_3 (KIMURA; MULLER, 1957; DETMANN et al., 2012). O cálculo da excreção de matéria seca fecal (EF) foi realizado com base na razão entre a quantidade de indicador fornecido e a concentração nas fezes, segundo a equação (SMITH; REID, 1955):

$$\text{EF} = (\text{CrFo}/\text{CrFe}) \times 100$$

em que: CrFo = quantidade de cromo fornecida (g); CrFe = concentração de cromo nas fezes (%).

Para análise da FDNi foram coletadas amostras de capim marandu através da técnica de pastejo simulado (descrito no item 5.1.2). As amostras de pasto e de fezes foram acondicionados, na proporção de 20 mg de MS/cm² de superfície (DETMANN et al., 2012), em sacos de tecido não tecido (TNT, 100g/m²) com dimensão de 4 x 5 cm (CASALI et al., 2009). Os sacos foram incubados em triplicata no rúmen de outros animais fistulados, por 264 horas (CASALI et al., 2008; VALENTE et al., 2011), posteriormente foram lavados em água corrente até total clareamento e imediatamente transferidos para estufa de ventilação forçada à aproximadamente 65°C por 72 horas. Em seguida, foi realizada análise de FDN destas amostras (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) para determinação da FDNi (MERTENS, 2002; DETMANN et al., 2012). A estimativa do consumo da forragem (CMS forragem) foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{CMS forragem} = (\text{EF} \times \text{FDNiFe})/\text{FDNip}$$

em que: FDNiFe e FDNip = concentração de FDNi nas fezes e na pastagem, respectivamente. O CMS Total foi estimado por meio da soma do CMS forragem e o suplemento fornecido (MS) por animal dentro do tratamento.

5.5 Características de crescimento

Os animais foram pesados sem jejum (8:00 h) e verificados altura de garupa (ALTG) e escore de condição corporal (ECC), a cada 28 dias dos 14,3±0,13 aos 24,6±0,13 meses de idade, totalizando 12 avaliações por ano. As avaliações de ECC foram pontuadas em escala de 0 a 9 para animais extremamente magros e gordos, respectivamente (WAGNER et al., 1988). A medida da ALTG foi tomada por meio de fitas métricas instaladas no interior da balança e representada por uma vertical baixada da porção anterior do sacro ao solo.

5.6 Concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios

As amostras de sangue total foram colhidas com intervalo de 28 dias dos 14,3±0,13 aos 24,6±0,13 meses de idade, totalizando 12 avaliações por ano, por venopunção da veia coccígea, localizada no sulco central da parte ventral da cauda, com a utilização de tubos contendo EDTA, fluoreto + EDTA e sem anticoagulantes (sistema Vacutainer[®], Labnew[®] Indústria e Comércio Ltda, Juiz de Fora, MG, Brasil). As amostras foram acondicionadas em geladeira com temperatura entre 4 e 6°C (por no máximo uma hora e meia) e, posteriormente, centrifugadas por 20 minutos a 3600 g. Depois da centrifugação, foram retirados cerca de 2 mL de plasma e soro sanguíneo, que por sua vez, foram divididos em duas alíquotas em eppendorfs de 1,5 mL e acondicionados em freezer -24°C, até a realização das análises.

Nas amostras de plasma (com EDTA) o hormônio testosterona total foi dosado utilizando Kit com marcador 125I e as quantificações deste hormônio foram realizadas por meio de radioimunoensaio (RIA) utilizando o kit Coat-A-Count[®] Total Testosterone (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). A quantificação da insulina e leptina foram realizadas com o kit Coat-a-Count Insuline (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) e kit Multi-species Leptin (Millipore, Bellerica, Massachusetts, EUA), respectivamente, de acordo com as recomendações do fabricante. O aparelho utilizado para leitura foi o Automatic Gamma Counter, modelo Wizard 1470 (Perkin Elmer, Finland).

As análises das concentrações séricas de lipoproteína de alta densidade (HDL) e colesterol total no soro sanguíneo (tubos sem anticoagulantes) foram realizadas utilizando kits de testes enzimáticos (Colesterol HDL e Colesterol Liquiform, Labtest Diagnóstica S. A., Brasil, respectivamente), de acordo com as recomendações do fabricante. O intervalo de referência do colesterol para bovinos foi de 80 a 180 mg/dL, seguindo as recomendações do laboratório de patologia clínica veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - UNESP Jaboticabal (Anexo 1; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). As análises de concentração de glicose no plasma sanguíneo (fluoreto + EDTA) foram realizadas utilizando o kit Glicose Liquiform VET (Labtest, Diagnóstica S. A. Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante: o intervalo de referência para bovinos de

acordo com o fabricante (LABTEST, 2017), é 55 a 95 mg/dL. O aparelho utilizado foi o analisador bioquímico semiautomático modelo LABQUEST® (LABTEST, Minas Gerais, Brasil).

5.7 Ultrassonografia testicular

Os exames ultrassonográficos testiculares foram realizados a cada 28 dias, dos $14,3 \pm 0,13$ aos $24,6 \pm 0,13$ meses de idade totalizando 12 avaliações por ano, com aparelho de ultrassom (Mindray, Z5 Vet, USA) e transdutor linear de 7,5Mhz. Foram realizadas varreduras em plano longitudinal e transversal do testículo direito e esquerdo. As imagens foram salvas em formato bitmap e foram posteriormente analisadas pelo *software* Image Pro Plus versão 7.01 (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA, USA), com valores numéricos de pixel em escala de cinza de 0 (preto absoluto) a 255 (branco absoluto).

Os valores médios de pixel (ecogenicidade), intensidade de pixel mínimo e máximo, heterogeneidade de pixel pelo desvio padrão dos valores médios de pixel (ecotextura) foram determinados por regiões circulares de 8 mm de diâmetro, sendo 6 no plano longitudinal e 4 no plano transversal (10 círculos por testículo, perfazendo um total de 20 regiões de interesse por animal; Figura 3). Em seguida, a média do valor para cada uma das variáveis foi calculada seguindo a metodologia descrita por Giffin et al. (2009).

Nos testículos também foram realizados exames com ultrassom Doppler para determinação da média do diâmetro da artéria testicular na região do cordão espermático. Foram utilizados 2 imagens do cordão espermático de cada testículo com 5 a 7 medidas de diâmetro dos maiores vasos testiculares (10 a 14 medidas por testículo, totalizando 20 a 28 regiões de interesse por animal; Figura 4). O Doppler Espectral foi utilizado para avaliar os índices vasculares: pico de velocidade sistólica (PVS), velocidade diastólica final (VDF), índices de resistência vascular [$IR = (PVS - VDF)/PVS$] e de pulsatilidade [$IP = (VPS - VDF) / M$, em que M representa a média entre VPS e VDF]. Foram utilizados 2 imagens da artéria testicular por testículo, perfazendo um total de 4 ondas vasculares por animal (Figura 4) (WOOD et al., 2010; FELICIANO; VICENTE; SILVA, 2012).

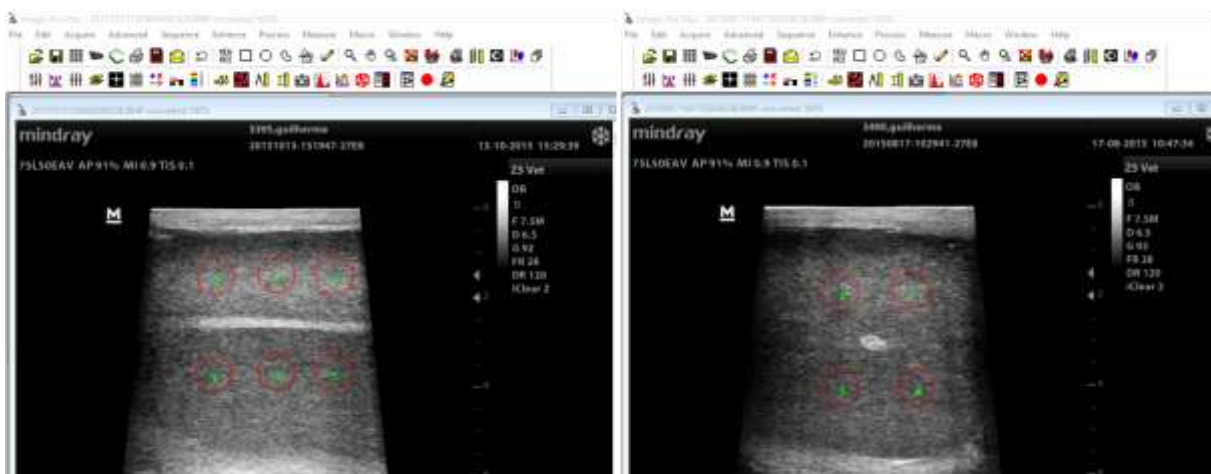


Figura 3. Análise de pixels das imagens ultrassonográficas do parênquima testicular em plano longitudinal e transversal pelo software Image Pro Plus versão 7.01.



Figura 4. Imagens ultrassonográficas Doppler para determinação do diâmetro e do fluxo sanguíneo da artéria testicular.

5.8 Avaliação andrológica

As avaliações andrológicas e anamnese geral (Anexo 2) foram realizadas a cada 28 dias. Estes exames foram iniciados nos animais com média de $14,3 \pm 0,13$ meses de idade e com término no início da estação de monta (média de $24,6 \pm 0,13$ meses), totalizando 12 avaliações por ano. Foi aferida a temperatura testicular e corporal dos animais através de termômetro infravermelho digital (Matsuri, DT-380, China). Foi posicionado o laser na região mediana do testículo para averiguar a temperatura testicular e a corporal foi aferida na região do reto do animal. A mensuração do perímetro escrotal (PE) foi efetuada com auxílio de uma fita milimetrada. A obtenção do tônus testicular foi efetuada pela palpação testicular, sempre pelo mesmo operador, com escore de 1 (Flácida) a 5 (Firme) (CBRA, 2013).

As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador Autojac[®] (Neovet, Brasil). A probe foi introduzida no reto do animal, com os eletrodos na posição ventral e foi realizado os estímulos de maneira pulsátil e continua até a ejaculação. Logo após as colheitas foram realizados os exames das características físicas do ejaculado. A motilidade espermática foi analisada em microscópio Nikon (modelo eclipse E200, Tóquio, Japão) com contraste de fase e foi estimada entre 0 a 100%, representando a porcentagem de espermatozoides em movimentos. O vigor espermático foi avaliado numa escala de 0 - 5, em que zero representa células paradas e cinco movimento vigoroso e de alta velocidade. A concentração espermática foi avaliada pela quantidade de espermatozoides totais do ejaculado por mL (câmara de Neubauer - diluição 1:100) (CBRA, 2013).

Adicionalmente, o sêmen *in natura* foi diluído em meio Botubov (sem glicerol; BotuFarma[®], Botucatu, Brasil) para concentração de 50×10^6 spz/mL. Após a diluição, o sêmen diluído foi submetido à análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA). Para tanto, 10 μ L da amostra do sêmen diluído foi colocado na câmara de Makler (SEFI Medical Instruments Ltda[®], Haifa, Israel) previamente aquecida (38°C), sendo observados cinco campos aleatórios e, no mínimo, 150 espermatozoides por campo. Os parâmetros reportados pelo CASA foram (Anexo 3) (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, et al., 2002):

- motilidade total (MT, %), porcentagem de células móveis;
- motilidade progressiva (MP, %), representada pela porcentagem de células movendo-se progressivamente;
- velocidade rápida (RAP, %), porcentagem de células com velocidade rápida;
- velocidade média de trajeto (VAP, μ m/s), representa a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula;
- velocidade em linha reta (VSL, μ m/s), representa a velocidade média percorrida em linha reta entre o primeiro e o último pontos da trajetória do espermatozoide;
- velocidade curvelinear (VCL, μ m/s), é a velocidade da trajetória real do espermatozoide;

- amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça espermática durante seu deslocamento;
- frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento;
- progressividade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP x 100;
- linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL x 100.

Para análise da morfologia dos espermatozoides, a amostra de sêmen foi acondicionada e estocada em 500 μL de solução formol salina tamponada (Anexo 4) para avaliação ao microscópio Nikon (Eclipse Ni-U, Nikon[®], Tóquio, Japão) com contraste diferencial de interferência de fase (DIC). Para esta avaliação foi adotada a metodologia preconizada por Blom (1973), sendo contadas 200 células registrando os defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda e de acrossoma, com classificação das anomalias em defeitos espermáticos maiores, menores e totais (CBRA 2013).

5.9 Criopreservação do sêmen

O sêmen de 12 animais/ano foi congelado na última coleta (outubro/2015 e outubro/2016), sendo 6 animais suplementados com AGs protegido (3 baixo CAR e 3 alto CAR) e 6 animais com suplementação controle, sem AGs (3 baixo CAR e 3 alto CAR). Foram selecionados os touros que apresentavam as melhores qualidade seminais de cada grupo, com base nos andrológicos anteriores e de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade total $\geq 60\%$; vigor ≥ 3 ; defeitos maiores $\leq 10\%$; defeitos totais $\leq 30\%$; e concentração $\geq 350 \times 10^6$ sptz/mL; CBRA, 2013) (Figura 5).

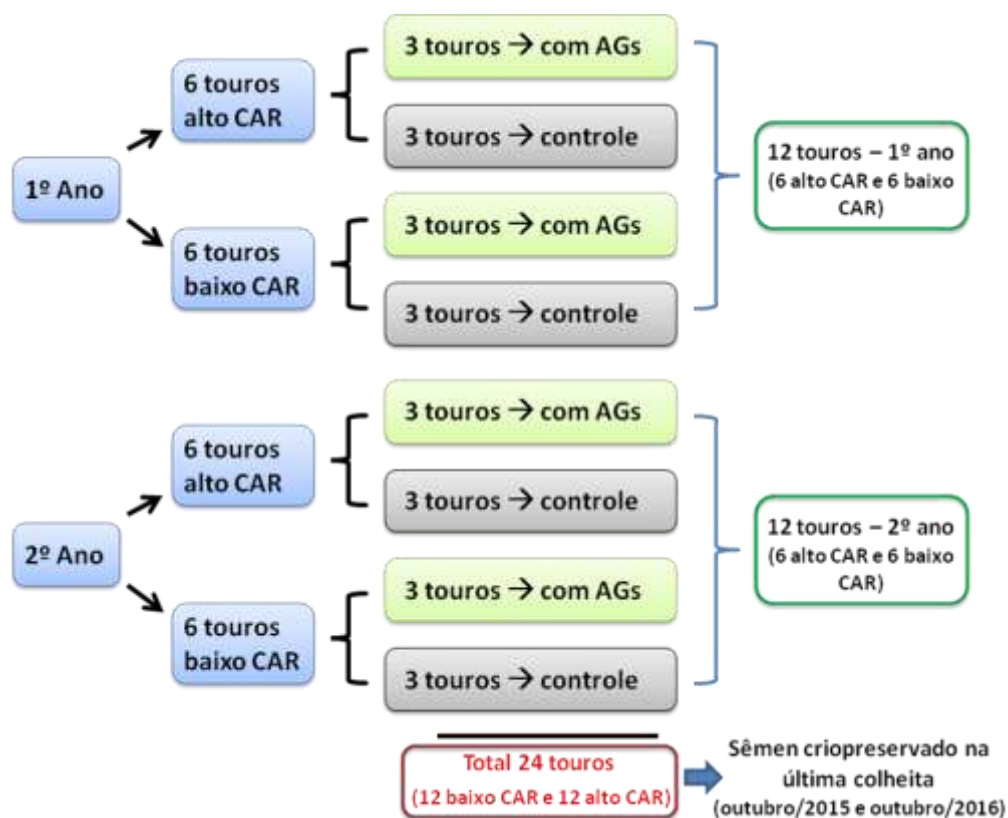


Figura 5. Delineamento experimental mostrando a divisão dos grupos para criopreservação espermática de acordo com o tratamento e ano.

O sêmen foi envasado à temperatura ambiente em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV[®] Technologies, França), com concentração final de 25×10^6 spz/palheta (50×10^6 spz/mL) e totalizando 20 palhetas por touro. O diluidor utilizado foi o BotuBov (BotuFarma[®], Botucatu, Brasil), contendo 7% do crioprotetor glicerol. As palhetas foram identificadas quanto ao tratamento e o número do animal e vedadas com álcool polivinílico. Para a refrigeração e criopreservação foi utilizado um sistema portátil programável de criopreservação do sêmen (TK 4000[®], Tetakon, Uberaba, Brasil) equipado com uma unidade geradora, acoplada a um porta-palhetas de aço-inox e uma caixa térmica plástica. O aparelho foi programado segundo o fabricante para realizar a refrigeração a partir da temperatura do laboratório (25°C) e seguindo uma curva de 0,25°C/min até 5°C, com duração em torno de 1h e 15 min, e uma curva de criopreservação de -20°C/min de 5°C até atingir -120°C. Após atingir esta temperatura (-120°C), as palhetas foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em racks identificadas até o momento de realização das análises pós-descongelção.

5.10 Avaliações do sêmen pós-descongelamento

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Duas palhetas de cada touro foram descongeladas para retirar o efeito palheta. As avaliações realizadas pós-descongelamento foram: avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA), teste de termorresistência rápido (TTR), integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo e capacidade fecundante pelo resultado da produção *in vitro* de embriões (PIVE).

5.10.1 Avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA)

As amostras descongeladas foram submetidas à análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA). O material foi previamente homogeneizado e avaliado em câmara de Makler (SEFI Medical Instruments Ltda®, Haifa, Israel) previamente aquecida (38°C), sendo observados cinco campos aleatórios para cada amostra e um número mínimo de 150 células por campo. Os parâmetros avaliados foram os mesmos mencionados no item 5.2.3: MT (%); MP (%); RAP (%); VAP ($\mu\text{m/s}$); VSL ($\mu\text{m/s}$); VCL ($\mu\text{m/s}$); ALH (μm); BCF (Hz); STR (%); e LIN (%).

5.10.2 Teste de termorresistência rápido (TTR)

As amostras foram submetidas ao teste de termorresistência rápido (TTR) em “banho-maria” a 46°C por 30 minutos (BARNABÉ et al., 1980; VIANNA et al., 2009). Após esse período as amostras de sêmen foram analisadas pela técnica CASA. Os parâmetros avaliados foram os mesmos mencionados no item 5.2.3 e 5.2.5.1.

5.10.3 Integridade da membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo

O equipamento utilizado para análise em citometria de fluxo foi o BD LSR II Fortessa (BD biosciences, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers azul 488 nm, 100 mW; vermelho 640 nm, 40 mW e violeta 405 nm. Para este estudo, a excitação utilizada foi 488 nm e os filtros de emissão utilizados foram 695/40 nm (MitoSOX™ Red e iodeto de propídio), 530/30 nm (SYTOX Green FITC-PSA). Para

excitação em 640 nm, o filtro de emissão foi de 660/20 nm (MitoSOXTM Red) e para excitação em 405 nm, o filtro de emissão foi de 450/50 nm (Hoechst 33342). No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados pelo programa BD FACSDiva™ software v 6.1 (BD biosciences, Mountain View, CA, USA).

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizado a associação de Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acordo Freitas-Dell'Aqua et al. (2012). Resumidamente, uma amostra de 200µL de sêmen foi diluído em TALP-PVA (100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM HEPES-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5x10⁶ espermatozoides/mL, foram adicionados 7 µM de H342, 1,5 µM de PI e 2 ng/ml de FITC-PSA. A amostra foi incubada durante 15min à 37°C ao abrigo da luz para a primeira análise e avaliadas posteriormente ao teste de termorresistência (TTR) de 1 hora à 37°C (2ª análise).

Nesta avaliação, quatro subpopulações foram identificadas: MPLAI (membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra), MPLAL (membrana plasmática e acrossomal lesionadas), MPAI (membrana plasmática e acrossomal íntegras) e MPIAL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada).

5.10.4 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram obtidos através de punções de folículos de ovários de bovinos abatidos no frigorífico Barra Mansa localizado em Sertãozinho - SP. Os ovários foram acondicionados em garrafas térmicas, mantidos à temperatura de 30-35 °C, e transportados para o laboratório, em torno de quatro horas do início da colheita, com distância aproximada de 35 km. Momentos antes da aspiração, os ovários foram lavados com solução salina a aproximadamente 35 °C. As punções foliculares foram realizadas com auxílio de seringa de 20 mL acoplada a agulhas de calibre 19G (BD, Juiz de Fora, MG, Brasil). Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL (Tipo falcon), que foram deixados em repouso por 15 minutos para decantação. Posteriormente, o sedimento foi

investigado para seleção dos oócitos e somente aqueles que possuíam camada de células do *cumulus* compacta, contendo pelo menos três camadas e aparência saudável (citoplasma homogêneo), foram selecionados para maturação *in vitro*. Para a avaliação da PIVE foram realizadas 6 rotinas com média de $34,74 \pm 1,52$ oócitos/touro/rotina. Em cada rotina foram avaliados os 12 touros, para diminuir possíveis influências exercidas pela rotina.

Os COCs selecionados foram lavados em meio TCM-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 0,2 mM de piruvato sódico, 10mM de HEPES sódico (Sigma Chemical Company, St.Louis, Mo., USA), 10 mM de HEPES ácido (Sigma), 25 mM de bicarbonato de sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 75 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 0,3% de albumina do soro bovino (BSA). Em seguida, foram lavados em meio de maturação B-199, constituído por meio TCM-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 0,2 mM de piruvato sódico, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 100 UI/mL de hCG (Vetercor; Intervet, São Paulo, SP, Brasil) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Cripion, Andradina, SP, Brasil). O cultivo de maturação foi feito em microgotas de 100 µL de meio B-199 (15 a 20 oócitos/gota) cobertas com óleo mineral, em incubadora com temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar por 24 horas.

Após a MIV, os COCs foram fertilizados *in vitro*. As palhetas de sêmen dos 12 touros foram descongeladas ao mesmo tempo a 37°C por 30 segundos e seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de densidade descontínua de Percoll durante 7 minutos a 2300 x g e posteriormente com meio TALP por 5 minutos a 690 g. O sedimento recuperado foi avaliado quanto a concentração e a motilidade espermática. A concentração espermática foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides/mL de meio de fecundação (TALP-FIV) suplementado com 4 µg/mL de solução PHE (1 mM hipotaurina, 2 mM penicilamina e 250 µM epinefrina) e 10 µg/mL heparina. Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio de fecundação com 15 a 20 oócitos/gota, onde permaneceram em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C por 18-22 horas.

Após a fertilização, os prováveis zigotos foram desnudados das células do cumulus por sucessivas pipetagens e transferidos para placas de cultivo celular contendo microgotas de 100 µL de meio "Synthetic Oviduct Fluid" modificado (mSOF) suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BME aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, 1µl/ml ciprofloxacina (cicpofloxacin Sigma Aldrich - 17850, St. Louis, Missouri, EUA). O cultivo foi realizado em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar à 38,5°C por 7 dias, e foi realizado feeding (troca de meio) no 3º e 5º dia de cultivo embrionário.

A taxa de clivagem (nº de oócitos clivados/ nº de oócitos totais / tratamento) foi avaliada 24 horas depois dos prováveis zigotos serem colocados em cultivo. No 7º dia a partir da fertilização foi verificada a taxa de blastocistos formados (nº de blastocistos formados/nº de oócitos totais / tratamento).

5.11 Análise dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas no tempo. As análises foram realizadas com auxílio do programa "Statistical Analysis Software Institute" (SAS), utilizando-se o procedimento PROC MIXED. As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ("LSMEANS") e comparadas, quando necessário, por meio da probabilidade da diferença ("PDIFF"), usando o teste "t". A significância estatística foi declarada quando $P < 0,05$.

O modelo estatístico para as variáveis de pastagem foi:

$$y = \mu + \text{ano} + \text{piq} + \text{temp} + \text{sup} * \text{temp} + e$$

onde:

y = variável estudada; μ = média; ano = efeito do ano; piquete = efeito do piquete; temp = efeito do tempo (meses); sup = suplementação; sup*temp = Interação sup x temp; e = erro.

O modelo estatístico para as outras variáveis foi:

$$y = \mu + \text{ano} + \text{sup} + \text{car} + \text{temp} + \text{sup} * \text{car} + \text{sup} * \text{car} * \text{temp} + e$$

onde:

y = variável estudada; μ = média; ano = efeito do ano; sup = efeito da suplementação; car = efeito do CAR; temp = efeito do tempo (meses); sup*car =

Interação sup x car; sup*car*temp = Interação sup x car x temp; e = erro. Nesse modelo, a estrutura de medidas repetidas foi considerada modelando as (co)variâncias residuais.

A estrutura da matriz de (co)variância que resultou em melhor ajuste do modelo foi escolhida com base nos menores valores para o Critério de Informação de Akaike (AIC) e o Critério de Informação Bayesiano (BIC).

6. Resultados e Discussão

6.1 Dados climáticos, características do pasto e consumo alimentar

Os dados meteorológicos mensais dos anos 2015 e 2016, segundo o Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2017) localizado no Instituto de Zootecnia/APTA/SAA de Sertãozinho - SP, estão apresentados na Figura 6. Pode-se observar as estações do ano de 2015 e 2016, sendo verão (21 de dezembro a 20 de março), outono (20 de março a 20 de junho), inverno (20 de junho a 22 de setembro) e primavera (22 de setembro a 21 de dezembro).

No inverno e primavera (avaliação no mês julho e outubro, respectivamente) foi observado menor consumo de massa seca (CMS) e menor ganho de peso médio diário (GMD) dos animais em relação ao verão e outono (Tabela 2), o que foi devido ao período de seca na região e a baixa qualidade da pastagem (Figura 6).

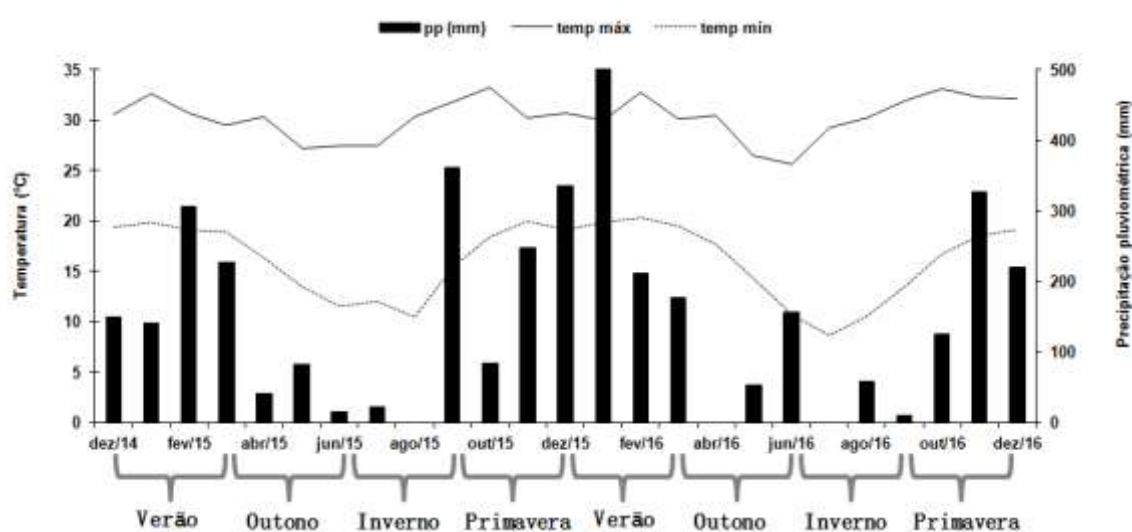


Figura 6. Temperatura mensal máxima e mínima (°C) e precipitação pluviométrica (mm) durante o período experimental (anos 2015 e 2016).

Tabela 2. Consumo de massa seca (CMS), ganho médio diário, características da pastagem e perfil de ácidos graxos de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, do pastejo simulado, de acordo com as estações do ano.

Consumo ²	Estação do ano ¹				EPM*	P-valor
	Verão	Outono	Inverno	Primavera		
GMD, kg/d	0,66 ^a	0,67 ^a	0,36 ^b	-0,004 ^c	0,03	<0,001
CMS Forragem, kg/d	8,69 ^a	8,33 ^a	5,36 ^c	6,14 ^b	0,28	<0,001
CMS Total, kg/d	9,67 ^a	9,31 ^a	6,34 ^c	7,11 ^b	0,28	<0,001
CMS Total, % PC	2,29 ^a	1,87 ^b	1,23 ^d	1,36 ^c	0,05	<0,001
Características da pastagem ³						
Alt forragem (cm)	86,25 ^a	80,0 ^a	56,75 ^b	32,0 ^c	5,55	<0,001
MSF (kg/ha)	5976,3 ^a	5266,4 ^a	4657,5 ^{ab}	2957,5 ^b	658,2	0,03
MS (%)	27,12 ^b	30,97 ^b	49,93 ^a	42,22 ^a	2,73	<0,001
MM (%MS)	7,35	7,63	7,02	6,57	0,37	0,27
PB (%MS)	10,54 ^a	9,0 ^a	5,14 ^b	8,15 ^a	0,82	0,004
EE (%MS)	1,59 ^a	1,46 ^a	1,08 ^b	1,02 ^b	0,11	0,01
FDN (%MS)	64,20 ^b	65,62 ^b	72,57 ^a	67,94 ^b	1,49	0,009
FDA (%MS)	28,90 ^c	32,49 ^{bc}	41,90 ^a	38,80 ^{ab}	2,34	0,005
Lignina (%MS)	3,2 ^b	3,6 ^b	5,35 ^a	5,5 ^a	0,54	0,02
FDNi (%MS)	21,49 ^b	22,03 ^b	34,87 ^a	33,83 ^a	1,83	<0,001
Perfil dos ácidos graxos (%)						
Palmítico (C16:1)	29,86	27,61	26,1	21,95	2,46	0,19
Estearíco (C18:0)	2,82 ^{bc}	3,51 ^b	5,43 ^a	2,68 ^c	0,23	<0,001
Oleico (C18:1n9c)	4,42 ^c	4,23 ^c	8,46 ^a	6,41 ^b	0,5	<0,001
Linoleico (C18:2n6c)	17,62	19,57	24,49	21,04	1,68	0,07
γ Linolenico (C18:3n6)	0,04 ^c	0,09 ^b	0,17 ^a	0,06 ^{bc}	0,01	<0,001
α Linolenico (C18:3n3)	37,78 ^a	36,46 ^a	23,21 ^b	42,06 ^a	2,82	0,003
Outros ⁴	7,43 ^b	8,51 ^{ab}	12,12 ^a	5,77 ^b	1,25	0,02

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos (P<0,05). ¹ Verão: mês fevereiro; Outono: mês maio; Inverno: mês julho; Primavera: mês outubro. ² GMD = ganho de peso médio diário; CMS Forragem = consumo de massa seca da forragem; CMS Total, kg/d = consumo de massa seca da forragem + suplemento fornecido; CMS Total, %PC = consumo de massa seca da forragem + suplemento fornecido em relação ao peso corporal. ³ Alt. forragem = altura de forragem; MSF = Massa seca da forragem; MS = Matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = fibra insolúvel em detergente ácido; Lignina; FDNi = fibra insolúvel em detergente neutro indigestível. ⁴ Outros ácidos graxos: laurico (C12:0); mirístico (C14); pentadecanoico (C15:0); palmitoleico (C16:1); heptadecenoico (C17:0); heptadecenoico (C17:1); cis-vacênico (C18:1n7); araquídico (C20:0); eicosenoico (C20:1n9); behênico (C22:0);tricosanóico (C23:0); lignocérico (C24:0).

No presente estudo, a redução na altura e massa seca da forragem (MSF) foi observado ao longo dos meses. Outros autores também relataram positiva associação entre altura do dossel, MSF e época do ano, assim no período de seca foi apresentado menor altura da forragem e MSF (FAGUNDES et al. 1999; MACHADO et al. 2007; FLORES et al. 2008). De acordo com MINSON (1990), o

limite mínimo de MSF em pastos de gramínea tropical, independentemente do cultivar e da altura do dossel, para não limitar o consumo de forragem é de 2.000 kg de massa seca/ha. No presente estudo, a menor MSF foi observado no outono com 2.957,5±658,2 kg de massa seca/ha, assim atendendo o limite mínimo de MSF estipulado por Minson (1990) (Tabela 2).

Os maiores CMS total e GMD durante o período das águas (verão e outono) está relacionado às melhores condições climáticas neste período (Tabela 2; Figura 6) proporcionando melhores condições da pastagem. Essas variações também foram observados por Euclides (2000), Molan (2004), Carnevalli et al. (2006) e Barbosa et al. (2007) para diversas gramíneas tropicais.

A deficiência de nutrientes específicos nas gramíneas pode limitar o consumo (MINSON, 1990; REIS et al., 2011). De acordo com MORAES et al. (2010), durante a estação seca do ano, as gramíneas tropicais apresentam baixo valor nutritivo e teor proteico inferior a 7,0%, sendo este valor mínimo para que os microrganismos do rúmen tenham condições de utilizar os substratos energéticos fibrosos da forragem ingerida (MILFORD; MINSON, 1966; MINSON; MILFORD, 1967). Porém, os animais em pastejo não consomem todas as frações das plantas, selecionando as que apresentam maior valor nutritivo, ou seja, folhas verdes e, durante a seca, também folhas senescentes. Assim, nas épocas de baixa qualidade do pasto, o equilíbrio entre o consumo de nitrogênio e a síntese de compostos nitrogenados no rúmen pode ser atingido com suplementação de proteína adicional à forragem (DETMANN; PAULINO; VALADARES FILHO, 2010).

No presente estudo, a suplementação oferecida para os animais dos 2 grupos supriram as deficiências da forragem na época seca do ano. Assim, o CMS total e GMD foram menores nessa época baseado nas características da forragem (massa e composição química), fato atribuído ao processo de senescência da parte aérea da forragem com aumento no teor de fibra e perda de seu valor nutritivo (VAN SOEST, 1994). No entanto foi notado que na estação da primavera houve aumento no CMS total em relação ao inverno e o GMD não acompanhando o CMS, isto deve ao crescimento corporal dos animais necessitando de maior consumo para satisfazer as exigências nutricionais de touros jovens. A pastagem de *Brachiaria brizantha* cv Marandu na primavera, apresentou redução nos teores de fibra em

relação ao inverno; isto se deve ao crescimento dessas plantas, devido a ocorrência de chuvas e aumento de temperatura (Figura 6), com consequente aumento das porções mais digestíveis, como folhas verdes (MORELLI, 2015).

Em sistema de pastejo sob lotação contínua, a oferta de folhas reduzem ao longo do tempo, devido não apenas às condições climáticas, que resultam em modificações na estrutura do dossel, mas também pelo consumo, pisoteio dos animais, idade fisiológica e fertilidade do solo ocorrendo variações na composição química do capim, alterando o valor nutritivo ao longo do ano (MOLAN 2004; CARNEVALLI et al. 2006; BARBOSA et al. 2007; FLORES et al. 2008). Embora não tenha sido feita a separação da massa de forragem em folhas, colmos e material morto, é possível observar aumento do valor de matéria seca de 27,12% (verão) para 49,93% (inverno) em função do aumento de colmos e material morto nas pastagens tropicais.

Não foram observadas diferenças no CMS dos touros jovens que receberam suplemento com ou sem AGs protegido, animais alto e baixo CAR e interação suplemento x CAR (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo alimentar e características de crescimento de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

Consumo alimentar ¹	Suplementos		CAR		EPM*	P-valor ³			
	AGs	Controle	Alto	Baixo		SUP	CAR	TEMP	SUP*CAR
CMS Forragem (kg/dia)	7,06	7,2	7,31	6,95	0,20	0,63	0,21	<0,001	0,43
CMS Total (kg/dia)	7,94	8,27	8,29	7,92	0,21	0,26	0,21	<0,001	0,43
Características de crescimento ²									
Idade inicial (mês)	14,34	14,36	14,3	14,4	0,13	0,87	0,59	.	.
Idade final (mês)	24,62	24,65	24,58	24,68	0,13	0,87	0,59	.	.
PC Inicial (kg)	390,12	388,92	380,95 ^b	398,08 ^a	5,43	0,87	0,03	.	0,55
PC final (kg)	522,13	520,24	508,08 ^b	534,29 ^a	6,09	0,82	0,004	.	0,08
PC médio (kg)	480,64	476,17	466,85 ^b	489,96 ^a	6,53	0,64	0,04	<0,001	0,54
PC ^{0,75} (kg)	102,49	101,78	100,29 ^b	103,98 ^a	1,05	0,65	0,04	<0,001	0,53
GMD (kg)	0,42	0,43	0,41	0,44	0,01	0,57	0,41	<0,001	0,54
ECC (1-9)	6,21	6,13	6,15	6,19	0,07	0,51	0,75	<0,001	0,74
ALTG (cm)	145,6	146,04	144,54 ^b	147,91 ^a	0,6	0,61	0,007	<0,001	0,17

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos ($P < 0,05$). ¹ CMS Forragem = consumo de massa seca da forragem; CMS Total = consumo de massa seca da forragem + suplemento fornecido; CAR médio = consumo alimentar residual médio por tratamento. ² PC = peso corporal; PC^{0,75} = peso corporal metabólico (Peso elevado a 0,75); GMD = ganho médio diário; ECC = escore de condição corporal; ALTG = altura de garupa. ³ SUP = valor de P entre suplementos; CAR = valor de P entre CAR; TEMP = valor de P entre as repetições (meses); SUP*CAR = valor de P entre as interações.

Fitzsimons et al. (2013), em estudo com novilhas da raça Simental alimentadas com dieta a base de silagem de capim, não verificaram diferenças no CMS para ambas as classes de CAR (alto e baixo). Meyer, Kerley e Kallenbach (2008), avaliando vacas gestantes e lactantes em pastagem, não observou diferenças no CMS entre animais alto e baixo CAR. A semelhança no consumo dos animais de diferentes classes em pastagem pode ser devida aos métodos utilizados para medir a ingestão alimentar (HERD et al., 2002). No entanto, Kelly et al. (2010) e Nascimento et al. (2015), avaliando animais em confinamento, demonstraram que animais com baixo CAR possuem menor CMS comparados com alto CAR. Segundo Allen (2000) e Carvalho et al. (2016), a adição AGs, n-3 e n-6 protegido ou não, em suplementos para bovinos não afetou o CMS, semelhantemente ao observado no presente estudo para touros jovens Nelore. Isto deve-se a suplementação com ou sem AGs (isoprotéicas) oferecida para os animais que satisfizeram as necessidades nutricionais para bovinos jovens em fase de crescimento nos tratamentos.

O peso médio dos animais para baixo CAR no início do experimento foi maior em relação aos animais alto CAR, apresentando em torno 4,5% mais pesados. Essa diferença foi observada no peso corporal médio (PC médio), metabólico ($PC^{0,75}$) e final (PC final) (Tabela 3). Na altura de garupa (ALTG) também foi observada diferença entre os animais baixo e alto CAR, com 2,3% mais altos para os animais baixo CAR. Diversos estudos (SCHENKEL et al., 2004; KELLY et al., 2011; SOBRINHO et al., 2011; STEYN et al., 2014) relataram que o CAR é independente geneticamente da ALTG e peso corporal (PC). Outros trabalhos (BASARAB et al., 2003; NKRUMAH et al., 2006; SMITH et al., 2010) correlacionaram eficiência alimentar com características relativas ao tamanho corporal e não encontraram diferenças de altura na garupa (ALTG) em classes divergentes de CAR. Trevisan (2016) também não observou diferença entre PC inicial, final, médio e metabólico, entre animais de diferente classe de CAR. No entanto, no presente estudo observou-se resultados diferentes no qual maior ALTG, PC para touros jovens classificados para baixo CAR em relação a alto CAR ($P < 0,05$), isto deve-se aos animais baixo CAR apresentarem PC iniciais maiores e este resultado se manteve durante todo o experimento. Em relação à suplementação com AGs protegido, não foi observada diferença para essas variáveis de desempenho corporal. Os suplementos com ou

sem AGs fornecidos no presente estudo foram isoprotéicos, assim satisfazerem as necessidades nutricionais de touros jovens em crescimento não apresentando reflexo nas características de crescimento. No mesmo sentido, Gholami et al. (2010) também não encontraram diferença para PC médio para touros holandeses suplementados ou não com fontes de AGPs (óleo de peixe, n-3).

6.2 Concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios

Na concentração de glicose, colesterol e HDL foram observadas diferença na interação tripla entre suplemento, CAR e meses do ano (Figuras 7, 8 e 9). As maiores concentrações séricas de glicose foram observados nos primeiros meses do experimento (dezembro à março) e posteriormente obteve diminuição para os quatro tratamentos em relação ao tempo ($P=0,01$) (Figura 7).

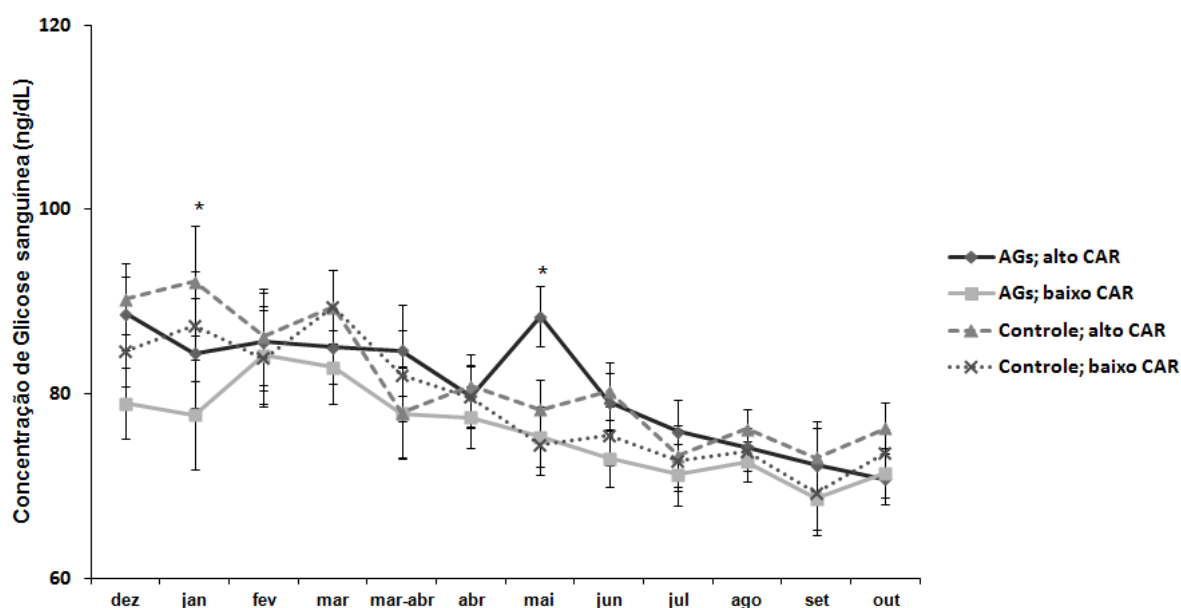


Figura 7. Concentração plasmática mensal de glicose (ng/dL) de touros jovens da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

* $P < 0,05$

A concentração plasmática adequada de glicose é essencial para o funcionamento normal do organismo, principalmente o sistema nervoso central (KERR, 2003). Os ruminantes absorvem pouca glicose a partir do trato digestivo, devido à extensa degradação dos carboidratos das dietas em AGs voláteis no

rúmen; sendo que os principais substratos para a síntese de glicose em ruminantes são propionato e aminoácidos gliconeogênicos (CLARK, 1975). Em estudo com animais jovens da raça Nelore, Gomes (2009) observou que a variação do CAR não foi relacionada com parâmetros sanguíneos e nível de glicose plasmática. No entanto, no presente estudo foi observado no mês de janeiro que os animais baixo CAR com suplementação com AGs protegido apresentaram menor concentração de glicose plasmática em relação aos outros grupos. E no mês de maio foi observado maior concentração para os animais alto CAR suplementados com AGs ($P=0,01$) (Figura 7). Aparentemente a suplementação com AGs protegida responde de maneira variável nas concentrações plasmáticas de glicose. Assim, Jenkis e Jenny (1989) e Gagliostro, Chilliard e Davicco (1991) observaram aumento nas concentrações de glicose, já Bermudes et al. (2003) não verificaram o mesmo ao suplementar bovinos com AGs protegidos.

Na Tabela 4 pode ser observado que os animais alto CAR apresentaram maior concentração de insulina em relação aos animais baixo CAR ($P=0,004$) e os animais baixo CAR suplementados com AGs protegido apresentaram maior concentração de leptina ($P<0,001$). Os touros suplementados com AGs protegido apresentaram maior concentração plasmática de testosterona em relação aos animais com suplementação sem AGs ($P=0,04$).

Tabela 4. Metabólitos sanguíneos e hormônios de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

Metabólitos ¹	Alto CAR		Baixo CAR		EPM*	P-valor ²				
	AGs	Controle	AGs	Controle		SUP	CAR	TEMP	SUP* CAR	SUP*CAR* TEMP
Glicose (mg/dL)	80,74	81,21	75,95	78,84	1,83	0,37	0,06	<0,001	0,51	0,02
Colesterol (mg/dL)	163,37	127,41	159,8	121,72	4,63	<0,001	0,32	<0,001	0,81	<0,001
HDL (mg/dL) ¹	65,92	59,56	68,51	56,39	2,33	0,0008	0,90	<0,001	0,23	0,02
Hormônios										
Insulina (μU/mL)	11,29 ^a	10,18 ^{ab}	7,39 ^c	9,46 ^b	0,54	0,38	<0,001	<0,001	0,004	0,13
Leptina (ng/mL)	11,47 ^{bc}	12,65 ^b	16,24 ^a	11,39 ^c	0,43	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,95
Testosterona (ng/mL)	12,3	10,64	12,2	10,36	0,85	0,04	0,81	<0,001	0,91	0,74

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos ($P < 0,05$). ¹ HDL = lipoproteína de alta densidade. ² SUP = valor de P entre suplementos; CAR = valor de P entre CAR; TEMP = valor de P entre as repetições (meses); SUP*CAR = valor de P entre as interações SUP e CAR; SUP*CAR*TEMP = valor de P entre as interações SUP, CAR e TEMP.

A insulina é um hormônio anabólico, produzido pelo pâncreas em resposta a alterações dos níveis plasmáticos de glicose (VOLP; REZENDE; ALFENAS, 2008). Pode ser notado na tabela 4 que as maiores concentrações de insulina foram observadas nos animais alto CAR, resultado semelhante foi observado numericamente para concentração de glicose. Assim, a elevação da glicose na corrente sanguínea estimula a secreção de insulina, pois existe uma interrelação de retroalimentação bem ajustada entre a velocidade de secreção de insulina e a concentração de glicose sanguínea (CUNNINGHAM, 2004). Richardson et al. (2004), observaram maiores concentrações de insulina e cortisol em animais alto CAR quando comparados aos animais baixo CAR. A maior concentração de insulina em animais alto CAR pode estar associada à sua maior deposição de gordura, uma vez que a insulina inibe a lipólise e estimula a lipogênese no tecido adiposo (ORR et al., 1988; HOCQUETTE et al., 1998). Kelly et al. (2009), estudando novilhas cruzadas taurinas, não encontraram correlações da concentração de insulina com ingestão de alimento, desempenho e medidas de eficiência alimentar, entre os animais alto e baixo CAR.

Segundo Barth, Brito e Kastelic (2008), a leptina e a insulina apresenta correlação positiva com o desenvolvimento testicular. A leptina é um regulador do metabolismo energético, que exerce influência no comportamento de consumo de alimentos e reprodução dos animais, sendo correlacionada à massa de gordura corporal (ZIEBA et al., 2005). Além disso, a concentração de leptina aumenta naturalmente conforme a puberdade se aproxima, em diversas espécies (DÍAZ-TORGA et al., 2001; GARCIA et al., 2002). No presente estudo, pode ser verificado que a leptina foi maior para animais baixo CAR suplementados com AGs protegido ($P < 0,001$) (Tabela 4), tais resultados pode estar relacionado com a ingestão de suplemento com maior proporção de AGs protegido e porque os animais baixo CAR apresentaram maior PC médio (Tabela 3).

Com relação à concentração plasmática de colesterol, foi observado diferença a partir do mês de abril no qual os animais suplementados com AGs protegido apresentaram maior concentração de colesterol em relação aos animais que receberam suplementação sem AGs (Figura 8) ($P < 0,001$). A concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) foi maior no mês de junho nos animais

suplementados com AGs protegido e animais alto CAR com suplementação controle em relação aos animais baixo CAR com suplementação controle. Nos meses de julho e agosto foi observado que os animais que receberam suplementação com AGs apresentaram maior concentração de HDL (Figura 9).

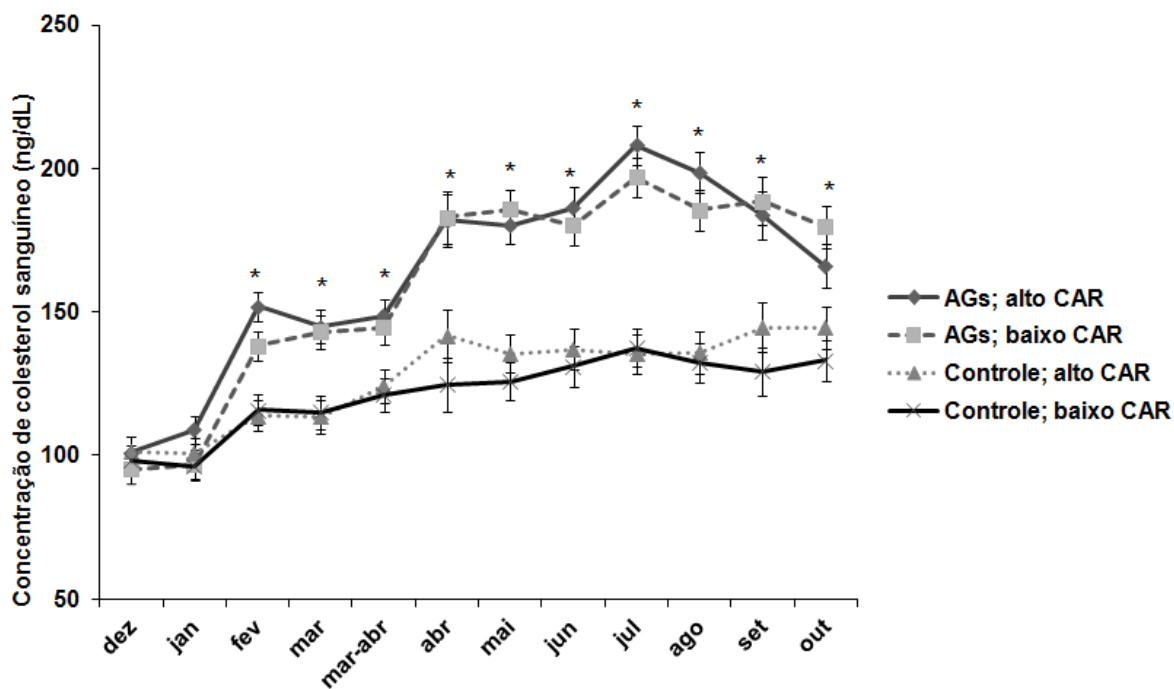


Figura 8. Concentração plasmática de colesterol (ng/dL) mensal de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

*diferença significativa entre as suplementações com e sem AGs protegido ($P < 0,05$).

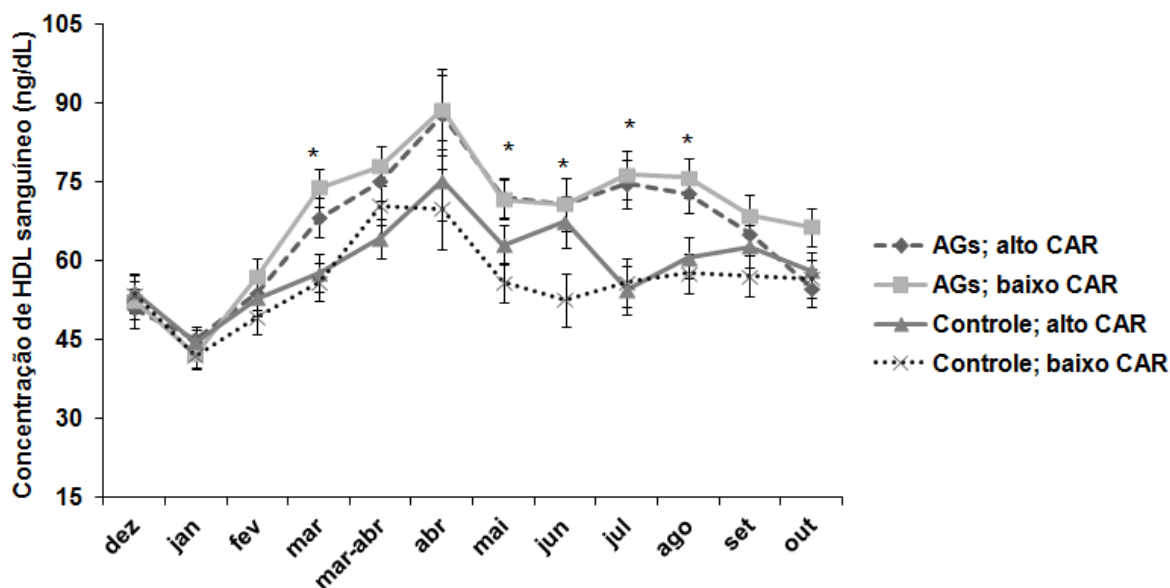


Figura 9. Concentração plasmática de HDL (ng/dL) mensal de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

*diferença significativa entre as suplementações com e sem AGs protegido ($P < 0,05$).

Trabalhando com suplementação com AGs protegido para bovinos, Freitas Júnior et al. (2010), observaram aumento no colesterol total, LDL e HDL sanguíneo em relação aos animais que não receberam suplementação com AGs. Resultado semelhante foi observado no presente estudo com suplementação prolongada de AGs protegido para touros jovens (14 aos 24 meses de idade), que de acordo com Schauff e Clark (1992) e Elliott et al. (1993), esse aumento da concentração de colesterol total no sangue ocorre em razão do aumento da absorção e transporte de elevados teores de AGs circulantes provindos da suplementação. Grande parte do colesterol sanguíneo é transportada por lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade (GRUMMER; CARROL, 1991).

Talavera, Park e Williams (1985) e Williams (1989) relataram que dietas com alto nível de AGs foram associadas à elevação do nível de colesterol sanguíneos. West e Hill (1990) obtiveram um aumento no teor de colesterol sérico de 221,74 mg/dL para 300,02 mg/dL, ao adicionar AGs protegido à dieta de vacas leiteiras. Do mesmo modo, Drackley e Elliott (1993), observaram um aumento na concentração de colesterol no plasma (176; 230; 247 e 250 mg/dL) ao suplementarem bovinos com AGs.

No presente estudo, os touros suplementados com AGs protegidos apresentaram maior concentração plasmática de testosterona em relação aos animais com suplementação sem AGs ($P=0,04$) (Tabela 4). A exposição nutricional prolongada de AGs protegidos na dieta (10 meses, janeiro à outubro) no período de transição da maturidade sexual (dos 14 aos 24 meses de idade) aumentou a produção de testosterona pelas células de Leydig. Isto pode ser explicado pelo aumento da concentração de colesterol sanguíneo apresentado pelos animais suplementados com AGs protegido, visto que o colesterol origina os hormônios esteróides, como a testosterona (WATERMAN; KEENEY, 1992). No entanto, em outros estudos, suplementando touros com AGs em período experimental inferior ao alcançado no presente estudo, não observaram diferença na concentração plasmática de testosterona (SANTOS et al., 1998; ARLAS et al., 2008; CHACUR et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012).

A produção de testosterona pode ser um indicador da fertilidade em touros jovens, por estar relacionada com a idade à puberdade e maturidade sexual (POST; CHRISTENSEN; SEIFERT, 1987). Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento das gônadas está relacionado ao aumento da produção de testosterona (CURTIS; AMANN, 1981; MOURA; ERICKSON, 1997), exercendo papel fundamental na manutenção da espermatogênese (ZIRKIN, 1998) e transcrição de genes que controlam a atividade mitótica e a diferenciação das células de Sertoli (BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003). Estudos publicados por Moura e Erickson (1997) demonstraram que os touros que atingem este período de transição (puberdade) mais precocemente têm testículos maiores e possui mais células germinativas em idades posteriores do desenvolvimento reprodutivo.

6.3 Ultrassonografia testicular

As análises de pixels do parênquima testicular não revelaram diferenças entre os tratamentos de suplementação com ou sem AGs protegido e o alto ou baixo CAR (Tabela 5). No entanto, em relação à idade dos animais avaliados (meses) foi observado diferença na média de pixels (Figura 10) ($P<0,001$).

Tabela 5. Características ultrassonográficas testiculares de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

Pixels ¹	Alto CAR		Baixo CAR		EPM*	P-valor ³				
	AGs	Controle	AGs	Controle		SUP	CAR	TEMP	SUP*CAR	SUP*CAR*TEMP
Médio	96,48	89,56	91,21	95,11	7,19	0,83	0,98	<0,001	0,46	0,06
Máx	144,08	136,18	137,47	142,06	8,98	0,85	0,96	<0,001	0,49	0,06
Mín	49,89	46,32	47,6	49,58	1,91	0,68	0,8	<0,001	0,16	0,24
Desv. Pad.	16,21	15,53	15,39	15,89	0,31	0,78	0,47	<0,001	0,07	0,72
US Artéria Testicular²										
Diâmetro (mm)	2,73	2,67	2,74	2,76	0,04	0,67	0,25	<0,001	0,34	0,09
PVS (cm/s)	15,76	15,32	16,28	15,81	0,46	0,33	0,28	<0,001	0,97	0,92
VDF (cm/s)	7,34	7,26	7,49	8,03	0,41	0,58	0,27	<0,001	0,45	0,49
IR	0,52	0,51	0,53	0,48	0,02	0,26	0,55	0,03	0,40	0,34
IP	0,73	0,72	0,75	0,65	0,03	0,26	0,67	0,02	0,37	0,62

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos ($P < 0,05$). ¹ Níveis de pixels médio; Máx = máximo; Mín = mínimo e Desv. Pad. = heterogeneidade de pixels representada pelo desvio padrão da imagem. ² Diâmetro da artéria testicular; PVS = pico de velocidade sistólica; VDF = velocidade diastólica final; IR = índice de resistência vascular; IP = índice de pulsatilidade vascular. ³ SUP = valor de P entre suplementos; CAR = valor de P entre CAR; TEMP = valor de P entre as repetições (meses); SUP*CAR = valor de P entre as interações SUP e CAR; SUP*CAR*TEMP = valor de P entre as interações SUP, CAR e TEMP.

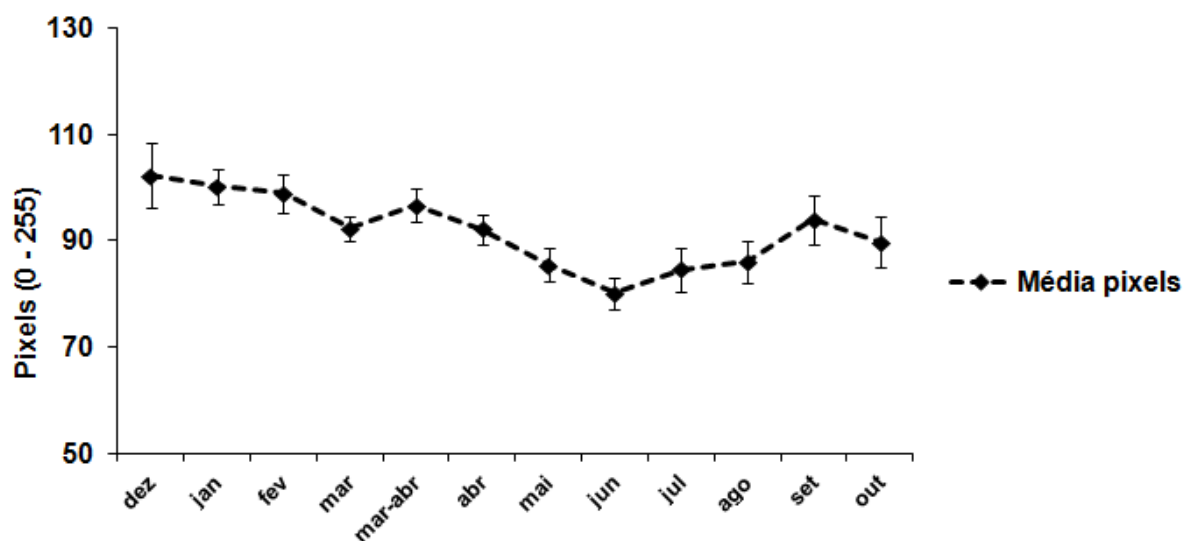


Figura 10. Pixels médio mensal do parênquima testicular de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

A utilização da ultrassonografia para avaliar o desenvolvimento e ecogenicidade testicular de touros jovens revela um parênquima testicular homogêneo e moderadamente ecogênico (PECHMAN; EILTS, 1987; CHANDOLIA et al., 1997; EDRASZCZYK, 2004; BRITO et al., 2004b; ABDEL-RAZEK; ALI, 2005).

Chandolia et al. (1997), Ahmad (2011), Brito (2012) e Pastore et al. (2015), ao estudarem o desenvolvimento testicular de touros jovens por ultrassonografia relataram aumento da ecogenicidade em proporção direta com a idade. De acordo com estes pesquisadores, o aumento da ecogenicidade de acordo com a idade ocorre por uma proliferação celular, a qual inicia-se com a divisão das espermatogônias e a formação de mais células maduras da espermatogênese. Posteriormente ocorre aumento da densidade das células, caracterizada pela formação das espermátides e, em seguida, transformação em espermatozoides.

Chandolia et al. (1997) e Ahmad (2011) verificaram também, outra fase, que a ecogenicidade testicular diminuiu, e atribuíram este fato à formação do lúmen dos túbulos seminíferos e consequente produção de fluido pelas células de Sertoli, necessários à espermatogênese. Isto justifica a queda da quantidade de pixels nos meses de dezembro à junho no presente estudo e posterior aumento em relação a idade (Figura 10).

Kastelic, Cook e Coulter (1997) observaram, em bovinos Canchim e Nelore, que o aumento dos valores na contagem de pixels encontra-se correlacionada com a diminuição dos defeitos espermáticos. No entanto, Tomlinson et al (2017) não observaram associação dos índices de pixels com qualidade seminal no momento do teste. Isto provavelmente é devido ao fato de que o parênquima testicular no momento da coleta não se correlaciona com o sêmen apresentado no momento da ejaculação.

No presente estudo foi observado aumento do diâmetro dos vasos do plexo pampiniforme e do PE apresentando valores iniciais médios aos 14,3±0,13 meses de idade de 2,14±0,05 mm e 27±0,34 cm, respectivamente e, na avaliação do mês de outubro (24±0,13 meses de idade) de 2,96±0,03 mm para o diâmetro e de 33±0,34 para PE (Tabela 5) (P<0,001), o que corrobora os achados de Brito et al. (2012). O aumento do diâmetro dos vasos testiculares pode melhorar a capacidade termorreguladora e a qualidade seminal. Segundo Brito et al. (2003) e Brito et al. (2012), a maior estabilidade dos processos da espermatogênese esteve associado ao aumento do diâmetro dos vasos testiculares e com diminuição dos defeitos espermáticos e aumento da porcentagem de espermatozoides normais.

O fluxo sanguíneo da artéria testicular analisado pelo doppler espectral não diferiram em relação aos tratamentos de suplementação prolongado com ou sem AGs protegido e alto ou baixo CAR (Tabela 5). Foi observado diferença apenas entre os meses analisados (Figura 11) (P<0,001).

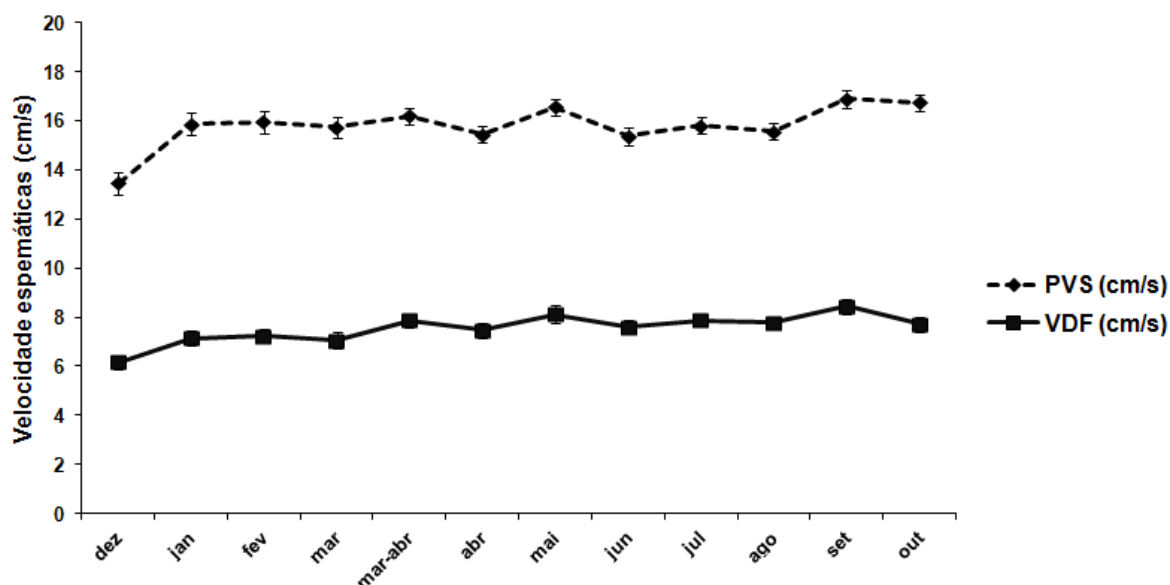


Figura 11. Pico de velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) mensais da artéria testicular de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

A técnica Doppler foi realizada por Carvalho et al. (2008) para avaliação da artéria testicular, apresentando ondas de padrão monofásico de baixa resistividade, com picos sistólicos amplos e contínuos e alta velocidade de fluxo diastólico, típica de órgãos que possuem demanda contínua de sangue. Na Figura 11, foi observado que PVS e VDF aumentaram de acordo com o desenvolvimento dos animais, apresentando correlação positiva com a idade (14 aos 24 meses de idade) e aumento do diâmetro dos vasos testiculares.

Segundo Pinggera et al. (2008) e Schurich et al. (2009), o IR está relacionado com a perfusão normal dos tecidos e alterações nos testículos levam ao aumento desses valores. Em homens oligospermicos foi observado IR maior quando comparado aos normospermicos, podendo servir de parâmetro para processos de infertilidade (PINGGERA et al., 2008). Em cães com casos de orquite, epididimite, criptorquidismo e tumores testiculares ocorreu aumento na vascularização, bem como aumento do IR e IP (BUMIN et al., 2007). No entanto, baixos valores desses índices indicam uma alta perfusão sanguínea testicular e afetando os estágios iniciais da espermatogênese, alterando-a devido a defeito energético nas mitocôndrias dos espermatozoides (ZELLI et al., 2013). Kutzler et al. (2011)

avaliando a fertilidade em camelídeos, observou que os parâmetros VPS e VDF apresentaram valores maiores em animais férteis. Assim, a ultrassonografia Doppler é importante na avaliação de afecções que acometem os testículos, sendo possível verificar mudanças, tanto na perfusão sanguínea quanto nos valores doppler espectral.

6.4 Avaliação andrológica

As análises de avaliação andrológica não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos suplementados com ou sem AGs protegido e alto ou baixo CAR (Tabela 6). No entanto, foi observado diferença entre as características reprodutivas e seminais de acordo com os meses do ano, resultado este que já era esperado pois ocorreu associação positiva entre a melhora das avaliações andrológicas e o aumento da idade dos animais (dos 14 aos 24 meses de idade). Observa-se associação inversa entre motilidade e concentração espermática com os defeitos maiores e totais, assim quando houve aumento de motilidade e concentração, os defeitos diminuíram, esta melhora da qualidade espermática ocorreu de acordo com o aumento da idade dos touros e proximidade com a maturidade sexual (Figura 12) ($P < 0,001$).

Tabela 6. Características reprodutivas e seminais de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

Variáveis média ¹	Alto CAR		Baixo CAR		EPM*	P-valor ³				
	AGs	Controle	AGs	Controle		SUP	CAR	TEMP	SUP*CAR	SUP*CAR*TEMP
T. testicular (°C)	33,04	33,03	32,93	33,08	0,10	0,48	0,77	<0,001	0,44	<0,001
T. corporal (°C)	37,1	37,09	36,85	37,16	0,10	0,17	0,42	<0,001	0,13	0,36
PE (cm)	30,74	30,12	31,69	31,15	0,59	0,33	0,10	<0,001	0,95	0,11
Tonus test (1-5)	3,39	3,25	3,38	3,4	0,08	0,48	0,40	0,001	0,39	0,99
Motilidade (%)	57,8	61,66	62,49	62,27	2,21	0,41	0,23	<0,001	0,36	0,91
Vigor (1-5)	2,62	2,71	2,74	2,73	0,09	0,67	0,42	<0,001	0,55	0,69
Conc (x 10 ⁶ /ml)	303,13	306,11	422,6	344,84	55,0	0,50	0,15	<0,001	0,46	0,70
Def. maiores (%)	33,75	23,47	24,16	25,75	5,12	0,40	0,48	<0,001	0,25	0,89
Def. totais (%)	41,46	36,15	34,28	35,23	4,18	0,60	0,33	<0,001	0,46	0,94
CASA²										
MT (%)	69,39	73,6	74,53	79,07	3,20	0,18	0,10	<0,001	0,95	0,49
MP (%)	53,6	57,11	56,83	60,96	2,99	0,21	0,24	<0,001	0,91	0,28
RAP (%)	65,77	69,01	69,97	60,96	3,18	0,24	0,14	<0,001	0,84	0,19
VAP (µm/s)	89,64	84,17	87,16	88,51	2,26	0,36	0,68	<0,001	0,14	0,01
VSL (µm/s)	74,53	70,69	72,87	74,34	1,83	0,52	0,59	<0,001	0,15	<0,001
VCL (µm/s)	143,0	132,2	138,4	138,7	4,63	0,26	0,84	<0,001	0,24	0,16
ALH (µm)	5,59	5,17	5,55	5,48	0,24	0,32	0,58	<0,001	0,49	0,42
BCF (Hz)	32,12	33,05	33,28	33,52	0,63	0,35	0,20	<0,001	0,59	0,54
STR (%)	83,23	84,21	83,84	84,26	0,58	0,24	0,58	<0,001	0,63	0,22
LIN (%)	55,96	57,68	56,7	56,37	1,21	0,57	0,81	<0,001	0,40	0,60

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos (P<0,05). ¹ T. Testicular = temperatura testicular; T. corporal = temperatura testicular; PE = perímetro escrotal; Tonus test = tonus testicular; Motilidade espermática; Vigor espermático; Conc = concentração espermática; Def. maiores = defeitos maiores; Def. totais = defeitos totais. ² Análise computadorizada (CASA); MT = motilidade espermática total; MP = motilidade progressiva; RAP = velocidade espermática rápida; VAP = velocidade de trajeto; VSL = velocidade em linha reta; VCL = velocidade curvilínea; ALH = amplitude do deslocamento lateral de cabeça; BCF = frequência de batimentos cruzados, STR = retilinearidade; LIN = linearidade de movimento. ³ SUP = valor de P entre suplementos; CAR = valor de P entre CAR; TEMP = valor de P entre as repetições (meses); SUP*CAR = valor de P entre as interação SUP e CAR; SUP*CAR*TEMP = valor de P entre as interações SUP, CAR e TEMP.

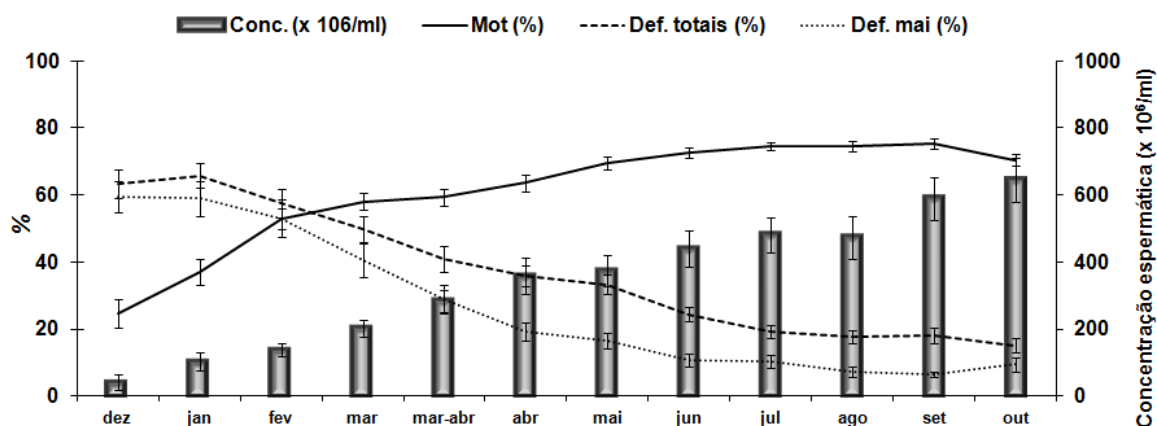


Figura 12. Motilidade, defeitos maiores, defeitos totais e concentração espermática mensal de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.
* Conc = concentração; Mot = motilidade; Def. totais = defeitos totais; Def mai = defeitos maiores.

Na Figura 13 foi observado associação positiva entre concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e PE de acordo com os meses do ano ($P < 0,001$), pois ocorreu um aumento dessas variáveis de acordo com o aumento da idade desses animais. Na Figura 14 também foi observado associação positiva com velocidade espermática avaliadas por CASA (VAP, VSL e VCL) e os meses do ano (idade dos animais).

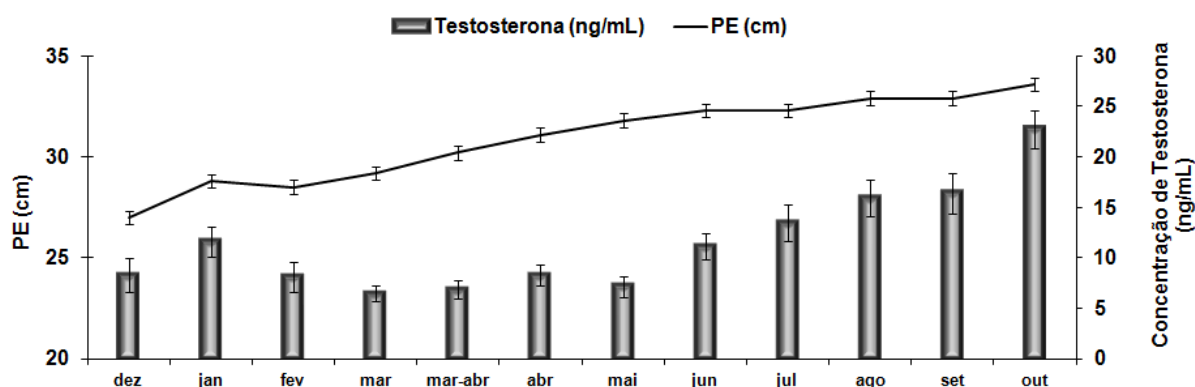


Figura 13. Perímetro escrotal (PE) e concentração de testosterona plasmática (ng/mL) de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

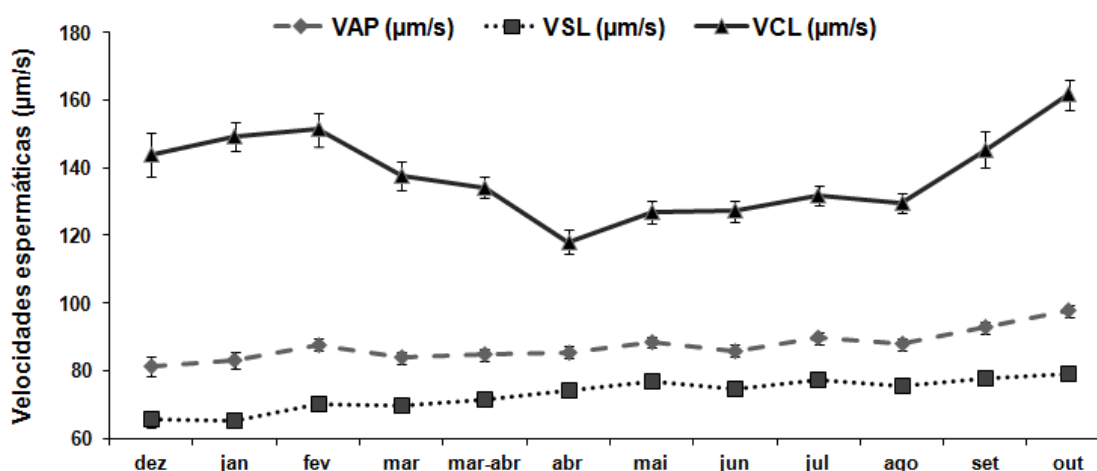


Figura 14. Velocidade de trajeto (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) mensais de amostras seminais de touros da raça Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

A puberdade é definida como sendo o período em que touros jovens são capazes de produzir espermatozoides viáveis, ocorra a maturação das glândulas acessórias, demonstrar interesse sexual, e desenvolvimento peniano para permitir a cópula e ejaculação (FOOTE, 1988; BRITO et al., 2004a). Além disso, esses autores caracterizam a maturidade sexual como sendo o período em que o animal pode ser utilizado na reprodução e apresenta ejaculado com 70% ou mais de espermatozoides normais (GARCIA; PINHEIRO; OKUDA, 1987).

De acordo com CBRA (2013) as características seminais desejáveis para sêmen fresco são: motilidade $\geq 60\%$, concentração $\geq 350 \times 10^6/\text{ml}$, defeitos maiores $\leq 10\%$ e totais $\leq 30\%$. No presente estudo, essas características foram observadas a partir do mês junho (Figura 12), no qual os animais apresentavam média de idade de 21 meses.

O PE apresentou associação positiva com a idade e desenvolvimento corporal e reprodutivo (Figura 13), fato que já é conhecido tanto para os zebuínos como para os taurinos (LUNSTRA et al., 1978; TROCÓNIZ et al., 1991; MOURA; ERIKSON, 1997; KASTELIC; THUNDATHIL, 2008; WALDNER et al., 2010; AHMAD et al., 2011). No presente estudo, as características de biometria dos testículos não foram associadas à eficiência no consumo alimentar. De modo semelhante, Hafla et al. (2012) e Fontoura et al. (2016) não encontraram correlação entre o PE e o CAR.

No entanto, Awda et al. (2013) observaram que touros com menor eficiência alimentar apresentaram PE 7,8% maior. Contudo, a medida do PE é um método subjetivo para avaliar os parâmetros reprodutivos, sendo necessário utilizá-lo em conjunto com outras variáveis ligadas à fertilidade de touros (AGDEX, 2002).

Awda et al. (2013) e Fontoura et al. (2016), avaliando touros de diferentes classes de CAR, observaram que animais com baixo CAR tiveram diminuição da motilidade espermática progressiva. Segundo Wang et al. (2012), a média de motilidade espermática para touros alto CAR foi maior do que baixo CAR. No entanto, Fox et al. (2004) não relataram diferença no PE, concentração do sêmen, motilidade e anormalidades espermáticas em touros Bonsmara classificados para alto, médio e baixo CAR. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, no qual não foi observada diferença entre os animais alto e baixo CAR e as suplementações com ou sem AGs protegido para as avaliações andrológicas.

Os AGs estão presentes nos espermatozóides de todas as espécies domésticas, em particular, ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22:6, n-3) e ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5, n-6) (POULOS 1986; ARRUDA et al., 2010). Os DHA e DPA além de serem adquiridos pela dieta, podem ser sintetizados pelo organismo a partir do ácido α -linolênico (n-3) e linoleico (n-6) (VOSS et al., 1991; SALEM et al., 2001; UAUY; CASTILLO, 2003). Em amostras seminais de carneiros alimentados com óleo de girassol, observou-se maior concentração, motilidade e velocidade espermática em comparação ao sêmen de animais sob dieta contendo milho (SELVARAJU et al., 2012). Também foi relatado a melhora da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática do sêmen fresco quando foi incluído fonte de AGs (óleo de peixe, n-3) na dieta de touros holandeses durante 90 dias (GHOLAMI et al., 2010). No entanto, em búfalos suplementados com dieta rica em AG (n-6) não foi observada diferença para concentração e motilidade espermática (ADEEL et al., 2009).

Segundo Fourie et al. (2004) e Barth, Brito e Kastelic (2008), a inclusão de maiores níveis energéticos na dieta de animais jovens é vantajosa para o desempenho produtivo, porém pode afetar as características seminais, devido à deposição de gordura na bolsa escrotal, principalmente no plexo pampiniforme. Esta gordura pode interferir no processo termorregulatório dos testículos, os quais são

vitais para a espermatogênese. Além disso, as altas temperaturas ambientais e os índices pluviométrico podem prejudicar a produção espermática (CHACÓN et al., 1999; NICHI et al., 2006). No entanto, no presente estudo não foi observada diminuição nas características seminais dos touros suplementados com AGs protegido em relação às estações do ano (Figura 12). Achados semelhantes de Brito et al. (2002), Gholami et al. (2010) e Chacur et al. (2013) não verificaram alterações no sêmen no verão para touros taurinos e zebuinos.

Em relação à cinética espermática analisada pela técnica CASA, Farrell et al. (1998), associaram vários padrões de movimento espermático com fertilidade *in vivo*. No presente estudo a velocidades espermáticas do sêmen fresco (VAP e VSL) apresentaram aumento de acordo com os meses dos anos, demonstrando associação com o aumento da idade dos touros (dos 14 aos 24 meses de idade) e com a melhora da qualidade seminal (Figura 15). Os valores de VAP, VSL e VCL apresentam grande relação com a fertilidade do sêmen *in vivo* e *in vitro* (CHAN, 1990; MARSHBURN et al., 1992; HOLT et al., 1997; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Além disso, maiores valores de VCL foram associados a maiores taxas de clivagens de oócitos fertilizados *in vitro*, indicando que o parâmetro de velocidade espermática apresenta grande importância para a determinação dos resultados de fertilidade (HWANG et al., 1999).

6.5 Citometria de fluxo e teste de termorresistência rápido (TTR)

Na citometria de fluxo não foi observada diferença entre as suplementações com ou sem AGs protegido e o alto ou baixo CAR para análise de membrana plasmática e acrossomal íntegra (MPAI) (Tabela 7). Após passagem pelo TTR de 1h à 37°C observa-se que a análise espermática para MPAI foram acima de 30% para todos os grupos, notando a ótima qualidade do sêmen dos animais avaliados no presente estudo.

Tabela 7. Análises de citometria de fluxo e do teste de termorresistência rápida do sêmen pós descongelamento de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos (AGs) protegido.

Citometria de Fluxo ¹	T (0)*				TTR (1h - 37°C)**				EPM*	P-valor ³				
	Alto CAR		Baixo CAR		Alto CAR		Baixo CAR			SUP	CAR	TTR	SUP* CAR	SUP*CAR* TTR
	AGs	Controle	AGs	Controle	AGs	Controle	AGs	Controle						
MPLAI (%)	20,76	26,65	23,15	29,58	16,4	24,23	16,11	27,86	3,78	0,005	0,42	0,15	0,67	0,89
MPAL (%)	30,38	24,03	26,56	26,41	43,98	32,8	39,75	33,93	4,87	0,09	0,74	0,003	0,40	0,89
MPAI (%)	46,7	48,65	49,08	42,61	34,13	39,3	40,65	34,58	5,09	0,70	0,89	0,01	0,18	0,96
MPIAL (%)	2,15	0,66	1,2	1,38	5,48	3,66	3,48	3,61	0,72	0,20	0,32	<0,001	0,12	0,87

CASA ²	T (0)*				TTR (30' - 46°C)#				EPM*	SUP	CAR	TTR	SUP* CAR	SUP*CAR* TTR
	AGs	Controle	AGs	Controle	AGs	Controle	AGs	Controle						
MT (%)	79,33	72	76,5	74,5	74,33	62,16	73,5	73	6,51	0,24	0,60	0,3	0,36	0,92
MP (%)	61,16	55	57,33	55,5	63,83	51,83	62,83	60,83	5,81	0,18	0,77	0,53	0,38	0,86
RAP (%)	76,83	66,33	73,83	69,16	70,66	58,5	71,16	69	6,64	0,12	0,56	0,37	0,40	0,93
VAP (µm/s)	87,86	77,66	93,1	81,66	71,98	70,81	77,65	74,8	3,34	0,01	0,05	<0,001	0,75	0,33
VSL (µm/s)	71,03	64,1	73,71	66,31	62,95	61,98	66,98	64,53	2,53	0,01	0,11	0,01	0,78	0,50
VCL (µm/s)	142,6	127,4	154,2	135,2	111,0	109,1	120,3	117,5	6,58	0,04	0,05	<0,001	0,8	0,47
ALH (µm)	5,86	5,56	6,21	5,76	4,63	4,6	4,96	4,88	0,29	0,32	0,18	<0,001	0,81	0,90
BCF (Hz)	25,75	26,76	25,41	27,1	25,11	27,51	26,51	29,6	1,47	0,05	0,40	0,37	0,74	0,76
STR (%)	81,83	83,16	80,16	82,16	88	87,83	86,83	86,5	1,44	0,52	0,25	<0,001	0,91	0,84
LIN (%)	53,33	53,83	51	52,83	58,83	58,66	58,66	58	1,76	0,77	0,42	<0,001	0,87	0,86

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos ($P < 0,05$). ¹ MPLAI = membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra; MPAL = membrana plasmática e acrossomal lesada; MPAI = membrana plasmática e acrossomal íntegra; MPIAL = membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada. ² Análise computadorizada (CASA): MT = motilidade espermática total; MP = motilidade progressiva; RAP = velocidade espermática rápida; VAP = velocidade de trajeto; VSL = velocidade em linha reta; VCL = velocidade curvilínea; ALH = amplitude do deslocamento lateral de cabeça; BCF = frequência de batimentos cruzados, STR = retilinearidade; LIN = linearidade de movimento. ³ SUP = valor de P entre suplementos; CAR = valor de P entre CAR; TEMP = valor de P entre os tempos de termorresistência; SUP*CAR = valor de P entre as interações SUP e CAR; SUP*CAR*TEMP = valor de P entre as interações SUP, CAR e TEMP. * T (0) = tempo 0 de análise do sêmen; ** TTR (1h - 37°C) = teste de termorresistência de 1 hora em 37°C; # TTR (30' - 46°C) = teste de termorresistência rápida de 30 minutos em 46°C.

A utilização da citometria de fluxo para avaliação espermática é objetiva e possui alta repetibilidade experimental, permitindo analisar milhares de células em pequeno espaço de tempo (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; HALLAP et al., 2006). A integridade funcional da membrana plasmática é de vital importância para a viabilidade dos espermatozoides ao processo de fertilização (GIL et al., 2000, RASUL; AHMAD; ANZAR, 2001; KASIMANICKAM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo Selvaraju et al. (2012), a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal foram maiores para espermatozoides de carneiros alimentados com dieta rica em AGs (n-3). A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra foi superior no sêmen descongelado de búfalos, quando alimentados com óleo ou semente de girassol (ADEEL et al., 2009). Para touros holandeses sob dieta rica em AG n-3 (óleo de peixe), foi observado tendência ($P=0,1$) em aumentar a porcentagem de espermatozoides com integridade da membrana plasmática, no sêmen pós-descongelamento (GHOLAMI et al., 2010).

No presente estudo foi relatado menor proporção de MPLAI, que indica somente lesão na membrana plasmática, para o grupo suplementado com AGs protegido ($P=0,005$), e isto pode ser explicado pela proteção que os AGs apresentam na membrana dos espermatozoides para os processos de criopreservação e posterior descongelamento (CEROLINI et al., 2001; CASTELLANO et al., 2010; MAIA et al., 2010). Hernández et al. (2012), suplementando touros com fontes de AGs protegida da bio-hidrogenação ruminal (200g/animal/dia), observaram aumentos da integridade de membrana plasmática e acrossomal. Assim, a suplementação de touros com AGs pode ajudar a diminuir as alterações morfológicas nas membranas dos espermatozoides induzidas pela criopreservação (HERNÁNDEZ et al., 2012).

A utilização de dietas ricas em AGs modifica a composição dos espermatozoides de várias espécies domésticas (BLESBOIS et al., 2004; PENNY et al., 2000), melhorando as características físicas e metabólicas das membranas plasmática e acrossomal (PALMA; MICELI, 2008). Dessa forma, pode-se conferir homogeneidade aos espermatozoides e incrementar a possibilidade de que maior

número chegue à junção útero-tubárica, aumentando a probabilidade de fecundação dos oócitos *in vivo* (PALMA; MICELI, 2008; PENNY et al., 2000).

No teste de termorresistência rápida (TTR) foi observada diferença entre as suplementações, com maiores velocidades espermáticas (VAP, VSL e VCL) para os tratamentos suplementados com AGs protegido em relação aos tratamentos com suplementação controle (sem AGs) (Tabela 7; Figura 15).

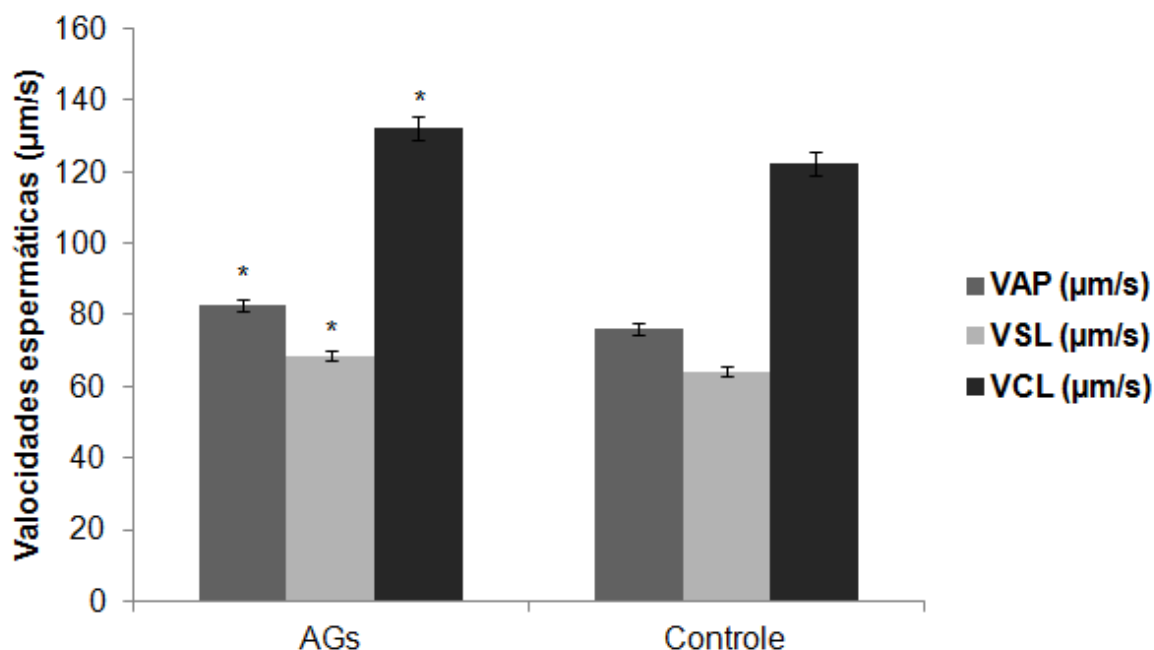


Figura 15. Velocidade de trajeto (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) encontradas pelo teste de termorresistência rápida (30 min - 46°C) de amostras seminais de touros jovens Nelore em pastejo suplementados (AGs) ou não com fonte de ácidos graxos protegido (Controle).

* $P < 0,05$.

Estas velocidades espermáticas determinam a habilidade de progressão dos espermatozoides em um determinado trajeto (CONTRI et al., 2010) e foram relacionadas com o processo de fecundação, uma vez que são aumentadas após a capacitação espermática (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). No presente estudo, o ambiente do plasma seminal dos animais que receberam a suplementação com AGs pode ter contribuído para o aumento dos valores de VAP, VSL e VCL. No entanto, Gholami et al. (2010), suplementando touros holandeses

com fonte de AGs (óleo de peixe, n-3), não encontraram diferença nos parâmetros de velocidades espermáticas e motilidade.

Nas análises pelo sistema CASA não foram observada diferença entre MT, MP e RAP no tempo de incubação (T-0 e TTR-30' a 46°C) mostrando a qualidade espermática dos animais após a passagem por processo de estresse térmico (46°C) e osmótico (osmolaridade acima de 1000mOsm/L determinada pelo uso do crioprotetor glicerol). No entanto, foi observada diferença no tempo de incubação para as variáveis de velocidade e ALH, STR e LIN. Tais alterações na qualidade seminal após passagem pelo TTR já eram esperadas no presente estudo, pois os espermatozoides passam por condições elevadas de temperatura durante período prolongado que pode ocasionar um aumento do metabolismo espermático (VIANNA et al., 2009). O STR e LIN após a passagem pelo teste de TTR apresentaram valores maiores e comportamento inverso às variáveis de velocidade (VAP, VCL e VSL) e ALH (Tabela 7). Apesar disso, a prova de termorresistência apresenta baixa sensibilidade para estimar fertilidade das amostras espermáticas, pois não imitam as reais condições uterinas sugeridas por Dimitropoulos (1967). Assim, são necessários avaliações em conjunto com outros testes para determinar a real capacidade fecundante da amostra espermática *in vitro*.

6.6 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Na análise de produção *in vitro* de embriões (PIVE) não foi verificado diferença para as taxas de clivagem e produção de blastocistos entre os tratamento suplementados com ou sem AGs protegido e alto ou baixo CAR (Tabela 8).

Tabela 8. Produção *in vitro* de embriões de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fontes de ácidos graxos (AGs) protegido.

Produção de embrião ¹	Alto CAR		Baixo CAR		EPM*	P-valor ²		
	AGs	Controle	AGs	Controle		SUP	CAR	SUP*CAR
Nº oócitos totais	207,2	202,7	206,2	210,3	4,27	0,96	0,45	0,32
Tx de clivagem (%)	78,96	79,54	75,57	78,78	2,15	0,38	0,34	0,54
Tx de blastocisto (%)	36,07	38,76	33,24	35,39	2,09	0,25	0,14	0,89

* EPM = erro padrão da média. Médias na linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo método dos quadrados mínimos ($P < 0,05$). ¹ Nº oócitos totais = soma do número de oócitos das 6 rotinas de PIVE; Tx de clivagem = taxa de clivagem; Tx de blastocisto = taxa de produção de blastocisto. ² SUP = valor de P entre suplementos; CAR = valor de P entre CAR; SUP*CAR = valor de P entre as interações SUP.

A avaliação do potencial de fertilidade do sêmen é muito importante antes da sua utilização na IA ou PIVE (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009). Devido a isso, diversos métodos *in vitro* para a análise do sêmen foram incorporados ao presente estudo para avaliar a qualidade seminal de touros jovens da raça Nelore. Mas, de acordo com Amann e Hammerstedt (2002), a taxa de clivagem é o melhor teste disponível *in vitro* para expressar a fertilidade do sêmen, pois requer espermatozoides móveis, com morfologia normal e capacidade para ativar o oócito (BRAUDMEIER et al., 2002). Segundo Sudano et al. (2011), touros que tiveram boas taxas de clivagem e produção de blastocistos *in vitro* apresentaram boas taxas de prenhez em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A técnica da PIVE, além de avaliar a capacidade de fertilização oocitária pela taxa de clivagem, monitora as fases iniciais do desenvolvimento embrionário e verifica a taxa de embriões produzidos (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009).

A possível razão da ausência de efeito no presente estudo, pode ter sido o fornecimento insuficiente de AGs protegido (200 g/animal/dia), pois não influenciou nos espermatozoides para a FIV e posterior PIVE. De acordo com Pereira et al. (2004) e Aardema et al. (2011), os ácidos graxos poliinsaturados possuem efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário e sobrevivência pós-criopreservação.

7. Conclusões

O consumo alimentar a pasto de touros jovens da raça Nelore não sofreu influência do CAR e da suplementação com AGs protegido.

A suplementação nutricional com AGs protegido para touros jovens da raça Nelore (dos 14 aos 24 meses de idade) classificados para CAR não influenciou as características ultrassonográficas testiculares, a qualidade do sêmen fresco e a produção de embriões *in vitro*.

Animais suplementados com fonte de AGs protegido (dos 14 aos 24 meses de idade) apresentaram maiores velocidades espermáticas (VAP, VSL e VCL) no sêmen pós-descongelamento. Além de apresentarem maiores concentrações plasmática de colesterol, HDL e testosterona, independentes do CAR.

8. Referências

AARDEMA, H., VOS, P. L. A. M., LOLICATO, F., ROELEN, B. A. J., KNIJN, H. M., VAANDRAGER, A. B., HELMS, J. B., AND GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p.62-69, 2011.

ABDEL-RAZEK, A. K.; ALI, A. Development changes of bull (*bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.1, p.23-27, 2005.

ADEEL, M.; IJAZ, A.; ALEEM, M.; REHMAN, H.; YOUSAF, M. S.; JABBAR, M. A. Improvement of liquid and frozen thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v.71, p.1220-1225, 2009.

AGDEX. 2002. Breeding soundness evaluation of bulls. Albertra Agriculture and Rural Development, Agdex 423/15-1, Disponível em 24 de abril de 2017. <http://www1.agric.gov.ab.ca/>.

AHMAD, E.; AHMAD, N.; NASEER, Z.; ALEEM, M.; KHAN, M. S.; ASHIQ, M.; YOUNIS, M. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.159–164, 2011.

AHMADI, B.; MIRSHAHI, A.; GIFFIN, J.; OLIVEIRA, M. E. F.; GAOA, L.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P. M. Preliminary assessment of the quantitative relationships between testicular tissue composition and ultrasonographic image attributes in the RAM. **The Veterinary Journal**, v.198, n.1, p.282-285, 2013.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.83, p.1598-1624, 2000.

ALVES, J. M.; MCMANUS, C.; LUCCI, C. M.; CARNEIRO, H. C. R.; DALLAGO, B. S.; CADAVID, V. G.; MARSIAJ, P. A. P.; LOUVANDINI, H. Estação de nascimento e puberdade em cordeiros Santa Inês. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.35, n.3, p.958-966, 2006.

AMANN, R. F.; HAMMERSTEDT, R. H. Detection of differences in fertility. **Journal Andrology**, v.60, p.1539-1551, 2002.

AMANN, R.; PICKETT, B. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ANUALPEC - **Anuário da Pecuária Brasileira**. p.62-64, 2016, 271p.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. CUNNIFF, P.; HORWITZ, W.; AOAC International. 16^a ed. Washington, 1995.

ARAVINDAKSHAN, J. P.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. **Theriogenology**, v.54, p.339-354, 2000.

ARCHER, J. A. REVERTER, A.; HERD, R. M.; JOHNSTON, D. J.; ARTHUR, P. F. Genetic variation in feed intake and efficiency of mature beef cows and relationships with post weaning measurements. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7. 2002, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: 7WCGALP, 2002. 4p.

ARLAS, T. R.; PEDERZOLLI, C. D.; TERRACIANO, P. B.; TREIN, C. R.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; CASTRO, F. S.; MATTOS, R. C. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3, p.306, 2008. Abstracts.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, p.145-150, 2005.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; ALONSO, M. A.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; GALLEGOS, A. M.; MARTINS, S. M. M. K.; GRANATO, T. M.; Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, p.393-400, 2010 (supl. especial).

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; JOHNSTON, D. J.; HERD, R. M.; RICHARDSON, E. C.; PARNELL, P. F. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency and other postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2805-2811, 2001.

ARTHUR, P. F.; HERD, R. M. Residual feed intake in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.269-279, 2008.

ARTHUR, P. F.; HERD, R. M.; WILKINS, J. F.; ARCHER, J. A. Maternal productivity of Angus cows divergently selected for post-weaning residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.985-993, 2005.

ASBIA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. <http://www.asbia.org.br/novo/informacoes/>, acesso em 07/01/2017.

AWDA, B. J.; MILLER, S. P.; MONTANHOLI, Y. R.; VANDER VOORT, G.; CALDWELL, T.; BUHR, M. M.; SWANSON, K. C. The relationship between feed efficiency traits and fertility in young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science**, v.93, p.185-192, 2013.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v.10, p.49-62, 2009.

BARBOSA, D. A. **Importância do exame andrológico na escolha do reprodutor**. 2006. Disponível em: <www.farmpoit.com.br/importancia-do-exame-andrologico>. Acesso em: 5 de janeiro de 2017.

BARBOSA, R. A.; NASCIMENTO JR, D.; EUCLIDES, V. P. B.; SILVA, S. C.; ZIMMER, A. H.; TORRES JR, R. A. A. Capim-tanzânia submetido a combinações entre intensidade e frequência de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.329-340, 2007.

BARNABÉ, V. H.; BARNABÉ, R. C., VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G., CASAGRANDE, J. F., ALMEIDA, C. A. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termorresistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3-4, p.6-12, 1980.

BARTH, A. D.; BRITO, L. F.; KASTELIC, J. P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, v.70, n.3, p.485-494, 2008.

BARTH, A. D.; OMININSKI, K. H. The relationship between scrotal circumference at weaning and at one year of age in beef bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v.4, p.541-546, 2000.

BASARAB, J. A.; McCARTNEY, D.; OKINE, E. K.; BARON, V. S. Relationships between progeny residual feed intake and dam productivity traits. **Canadian Journal of Animal Science**, v.87, p.489-502, 2007.

BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; AALHUS, J. L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, n.2, p.189-204, 2003.

BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E.; ZHANG, H.; SMITH, R. G.; FORREST, D. W.; SPROTT, L. R.; AX, R. L. Fertility-Associated Antigen on Bull Sperm Indicates Fertility Potential. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2032-2039, 1998.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.189-194, 2014.

BERMUDES, R.F.; LÓPEZ, J.; GALLARDO, M.; SILVA, J. H. S.; CUATRIN, A. Gordura protegida na dieta de vacas de alta produção a campo, em alfafa verde ou pré-secada, na fase inicial de lactação. Parâmetros plasmáticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.405-410, 2003.

BERRY, D. P.; CROWLEY, J. J. Cell biology symposium: genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.91, p.1594–1613, 2013.

BEZERRA, L. R. **Desempenho e comportamento metabólico de cordeiros da raça Santa Inês alimentados com diferentes concentrações de *Spirulina platensis* diluída em leite de vaca**. 2006. 41f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no semi-árido) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB, 2006.

BLESBOIS, E.; DOUARD, V.; GERMAIN, M.; BONIFACE, P.; PELLET, F. Effects of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. **Theriogenology**, v.61, n.2-3, p.537-549, 2004.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v.27, p.911-917, 1959.

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

BRACKETT, B. G. Applications of in vitro fertilization. In: **New Technologies in Animal Breeding** (B. G. BRACKETT, G. E. SEIDEL, JR. AND S. M SEIDEL, EDS.). Academic Press, New York, p. 141-161, 1981.

BRADFORD, B. J.; OBA, M.; EHRHARDT, R. A.; BOISCLAIR, Y. R.; ALLEN, M. S. Propionate is not an Important Regulator of Plasma Leptin Concentration in Dairy Cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.30, p.65-75, 2006.

BRAUDMEIER, A. G.; DEMMERS, J. M.; SHANKS, R. D.; SAACKE, R. G.; MILLER, D. J. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucid as an indicator of fertility. **Journal of Andrology**, v.23, p.645-651, 2002.

BRIAN, S. K; SURAI, P. F; ROOKE, J. A. Regulation of Avian and Mammalian Sperm Production by Dietary Fatty Acids. In: Stephanie R.V. **Male Fertility and Lipid Metabolism**. United States: AOCS Press, p.96-117, 2003.

BRITO, L. F. C. **Nutrition, metabolic hormones, and sexual development in bulls**. Doutorado, University of Saskatchewan, Saskatoon; 2006, 179p.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; WILDE, R. E.; KASTELIC, J. P. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. **Theriogenology**. v.78, p.69–76, 2012.

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

BRITO, L. F., BARTH, A. D.; RAWLINGS, N. C.; WILDE, R. E.; CREWS, D. H.; BOISCLAIR, Y. R.; EHRHARDT, R. A.; KASTELIC, J. P. Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. **Reproduction**. v.134, p.171-181, 2007. doi:10.1530/REP-06-0353.

BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v.61, p.511–528, 2004b.

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 quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.58, p.1175– 1186, 2002.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A. E.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos Taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.1-15, 2003.

BUDRAS, K. D.; MCCARTHY, P. H.; FRICKE, W.; RICHTER, R. **Anatomy of the dog**. 5^a ed. London: Manson, 2007. p.68-70.

BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Vicosa - UFV - Vicosa, 2000.

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

BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid Hormone, Retinoic Acid, and Testosterone Suppress Proliferation and Induce Markers of Differentiation in Cultured Rat Sertoli Cells. **Endocrinology**. v.144, n.9. p.3722–3731, 2003.

CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H.; PASTORE, A. A.; CANOLA, J. C.; MERCADANTE, M. E. Z.; OLIVEIRA, J. A. Padrão ultrassonográfico do parênquima, mediastino e túnicas testiculares em bovinos jovens da raça Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.4, p. 899-905, 2010.

CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H.; PASTORE, A. A.; CANOLA, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; MERCADANTE, M. E. Z. Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, p.75-82, 2012.

CARNEVALLI, R. A.; DA SILVA, S. C.; OLIVEIRA, A. A.; UEBELE, M. C.; BUENO, F. O.; HODGSON, J.; SILVA, G. V.; MORAES, J. P. Herbage production and grazing losses in *Panicum maximum* cv. Mombaça pastures under four grazing managements. **Tropical Grasslands**, v.40, p.165-176, 2006.

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

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; STERMANN, F. A.; BARROS, N.; CERRI, G. G. Ultra-sonografia duplex-Doppler na avaliação morfológica e hemodinâmica das artérias aorta e mesentérica cranial em cães. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**. São Paulo, v.45, n.1, p.24-31, 2008.

CARVALHO, I. P. C.; FIORENTINI, G.; BERNDT, A.; CASTAGNINO, P. S.; MESSANA, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S.; REIS, R. A.; BERCHIELLI, T. T. Performance and methane emissions of Nelore steers grazing tropical pasture supplemented with lipid sources. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.45, n.12, p.760-767, 2016.

CARVALHO, N. C. **Sistema reprodutivo masculino**: anatomia dos animais domésticos. 2012. Disponível em: <<http://cursomedicinaveterinaria.blogspot.com.br/2012/02/sistema-reprodutor-masculino.html>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2017.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**. n.37, p.335-342, 2008.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; CUNHA, M.; DETMANN, K. S. C.; PAULINO, M. F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. n.38, n.1, p.130-138, 2009.

CASTELLANO, C. A.; AUDET, I.; BAILEY, J. L.; LAFOREST, J. P.; MATTE, J. J. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17°C or cryopreserved. **Theriogenology**. v.74, p.1482-1490, 2010.

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

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v.121, n.3, p.395-401, 2001.

CIIAGRO. **Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas**. <<http://ciiagro.sp.gov.br/>> , disponível em 10/06/2017.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocyte for clinical use. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.4, n.2, p.103-120, 1998.

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

CHACUR, M. G. M.; AURÉLIO, P. T. F.; OBA, E.; LAPOSY, C. B.; SCALON JÚNIOR, O. Leandro Inague⁵; Sérgio do Nascimento Kronka⁶. Influência de um nutracêutico no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos taurus indicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.2, p.439-450, 2010.

CHACUR, M. G. M.; MIZUSAKI, K. T.; GABRIEL FILHO, L. R. A.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Seasonal effects on semen and testosterone in zebu and taurine bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.41, p.1-5, 2013.

CHAN, S. Y.; TSOI, W. L.; LEUNG, J. N. G. V.; WANG, C. The accuracy of sperm concentration determination by the automated Cell Soft semen analyzer before and after discontinuous Percoll gradient centrifugation. **Andrologia**, v.22, p.55-61, 1990.

CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B. C.; PIERSON, R.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v.48, p.119-132, 1997.

CHRISTIE, W. W. W. **Gas chromatography; a practical guide**. 1st edn, Ayr, Scotland: The Oily Press; 1989.

CLARK, J. H. Lactational responses to postruminal administration of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v.58, p.1178-1197, 1975.

COELHO, L.; ESPER, C.; GARCIA, J.; VANTINI, R.; ALMEIDA JÚNIOR, I. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.397-402, 2000.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, n.3, p.424-435, 2010.

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

COULTER, G. H.; BAILEY, D. R. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. **Theriogenology**. v.30, p.743–9, 1988.

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.297–311, 1979.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Vet Zootec**, v.16, p.335-342, 2009.

CREWS, D. H. JR. Genetics of efficient feed utilization and national cattle evaluation: A review. **Genetics and Molecular Research**. v.4, p.152-165, 2005.

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

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinaria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 579p.

CURTIS, B. K.; AMAN, R. P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v.53, p.1645-1658, 1981.

DANCE, A.; THUNDATHIL, J.; WILDE, R.; BLONDIN, P.; KASTELIC J. Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**. v.98, p.987–998, 2015. doi:10.3168/jds.2014-8564

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2010. p.191–240.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; ZERVOUDAKIS, J. T.; VALADARES FILHO, S. C.; EUCLYDES, R. F.; LANA, R. P.; QUEIROZ, D. S. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A. de.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C. de.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. L.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. **Métodos para análise de alimentos**. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Ciências Animal - INCT-Ciência Animal. 2012, 214p.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F. Predição do valor energético de dietas para bovinos a partir da composição química dos alimentos. In: VALADARES FILHO, S. C.; MARCONDES, M. I.; CHIZZOTTI, M. L.; PAULINO, P. V. R. **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados**. 2^a ed. Viçosa, MG: UFV, DZO, p.47-64, 2010.

DÍAZ-TORGA, G. S.; MEJÍA, M. E.; GONZÁLEZ-IGLESIAS, A.; FORMÍA, N.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I. M. Metabolic cues for puberty onset in free grazing holstein heifers naturally infected with nematodes. **Theriogenology**, v.56, n.1, p.111-122, 2001.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de valeur fécondante du sperme congelé. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.4, p.215–224, 1967.

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

DOLATPANAH, M. B.; TOWHIDI, A.; FARSHAD, A.; RASHIDI, A.; REZAYAZDI, A. effects of dietary fish oil on semen quality of goats. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.21, p.29-34, 2008.

DRACKLEY, J.K.; ELLIOTT, J. P. Milk composition, ruminal characteristics, and nutrient utilization in dairy cows fed partially hydrogenated tallow. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.183, 1993.

ELER, J. P. Estratégias para antecipar a puberdade em novilhas de corte. In: **SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE**, 4, 2004, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa: UFV, p.449-458, 2004.

ELLIOTT, J.P.; DRACKLEY, J. K.; SCHAUFF, D. J.; JASTER, E. H. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.3, p.775-789, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. PECUÁRIA SUL BAGÉ/RS, REVISTA OVINOS **Cuidado com o carneiro: exame andrológico**. 2014. Disponível em: <<http://www.gestaonocampo.com.br/biblioteca/cuidados-com-o-carneiro-exame-andrologico/>>. Acesso em: 11 de janeiro de 2017.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., n.47 p.243-255, 1993.

EUCLIDES, V. P. B.; CARDOSO, E. G.; MACEDO, M. C. M.; OLIVEIRA, M. P. Consumo Voluntário de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Brachiaria brizantha* cv.

Marandu sob Pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.2200-2208, 2000 (Suplemento 2).

EVANS, A. C. O.; PIERSON, R. A.; GARCIA, A.; MCDOUGALL, L. M.; HUDRKA, F.; RAWLINGS, N. C. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v.46, p.345–357, 1996.

FAGUNDES, J. L.; SILVA, S. C.; PEDREIRA, C. G. S.; CARNEVALLI, R. A.; CARVALHO, C. A. B.; SBRISSIA, A. F.; PINTO, L. F. M. Intensidades de pastejo e a composição morfológica de pastos de *Cynodon* spp. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, 1999.

FARRELL, P. B., PRESICCE, G. A., BROCKETT, C. C., FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; SILVA M. A. M. Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumors. **JSAP - Journal of Pan African Studies**, Los Angeles, v.53, n.6, p.332-337, 2012.

FERRARA, F.; DAVERIO, E.; MAZZINI, G.; BONINI, P.; BANFI, G. Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. **Clinical Chemistry**, v.43, p.801-807, 1997.

FIDELIS, H. A.; BONILHA, S. F. M.; TEDESCHI, L. O.; BRANCO, R. H.; CYRILLO, J. N. S. G.; MERCADANTE, M. E. Z. Residual feed intake, carcass traits and meat quality in Nellore cattle. **Meat Science**, v.128, p.34–39, 2017.

FITZSIMONS, C.; KENNY, D.A.; DEIGHTON, M.H.; FAHEY, A.G.; MCGEE, M. Methane emissions, body composition, and rumen fermentation traits of beef heifers differing in residual feed intake. **Journal of Animal Science**, v.91, p.5789-5800, 2013.

FLORES, R. S.; EUCLIDES, V. P. B.; ABRÃO, M. P. C.; GALBEIRO, S.; DIFANTE, G. S.; BARBOSA, R. A. Desempenho animal, produção de forragem e características estruturais dos capins marandu e xaraés submetidos a intensidade de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.8, p.1355-1365, 2008.

FLORMAN, H. M.; FIRST, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. **Developmental Biology**, Maryland Heights, v.128, n.2, p.453- 463, 1988.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p.497-509, 1957.

FONSECA, V. O. Avaliação reprodutiva de touros para a monta a campo: análise crítica. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, supl.6, p. 36-41, 2009.

FONSECA, V. O.; FRANCO, C. S.; BERGMANN, J. 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 Medicina Veterinária Zootecnia**, v.49, p.53-62, 1997.

FONTOURA, A. B. P.; MONTANHOLI, Y. R.; DIEZ DE AMORIM, M.; FOSTER, R. A.; CHENIER, T.; MILLER, S. P. Associations between feed efficiency, sexual maturity and fertility-related measures in young beef bulls. **Animal**, v.10, n.1, p.96–105, 2016. doi:10.1017/S1751731115001925

FOOTE, R. H. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4ª ed. São Paulo: Manole, 1988, v.5, p.601-631.

FORBES, J. M. A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. **Nutrition Research Reviews**, v.20, p.132-146, 2007.

FORERO-GONZALEZ, A. R.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Internation Journal of Andrology**, v.44, p.154-159, 2012.

FOULADI-NASHTA, A. A.; CAMPBELL, K. H. S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. **Reproduction**, v.131, n.3, p.449-460. 2006.

FOURIE, P. J.; SCHWALBACH, L. M.; NESER, F. W. C.; VAN DER WESTHUIZEN, C. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v.54, p.53-59, 2004.

FOX, J. T.; CARSTENS, G. E.; BROWN, E. G.; WHITE, M. B.; WOODS, S. A.; WELSH JR., T. H.; HOLLOWAY, J. W.; WARRINGTON, B. G.; RANDEL, R. D.; FORREST, D. W.; LUNT, D. K. Net feed intake of growing bulls and relationships with performance, fertility and ultrasound composition traits. **Beef Cattle Research in Texas**, p.117–120, 2004.

FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.; PRADA E SILVA, L. F.; GANDRA, J. R.; MATURANA FILHO, M.; FODITSCH, C.; VENTURELLI, B. C. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. **Ciência Rural**. ISSN 0103-8478. 2010.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; CRESPILO, A. M.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.213-222, 2009.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUASTI, P. N. ; MONTEIRO, G. A. ; MAZIERO, R. R. D. ; DELLAQUA JR, J. A. ; PAPA, F. O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. In: IV ISABR, 2012, Campinas. **Animal Reproduction**, v.9. p.941-941, 2012.

FRENEAU, G. E. **Biopsia testicular aberta efetuada na puberdade e na pós-puberdade e suas conseqüências sobre a gametogênese e o sêmen de touros Nelore**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária-UFMG. 1996. 167p. (Tese de Doutorado).

GÀBOR, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, Philadelphia v. 50, n. 2, p. 223-228, 1998.

GAGLIOSTRO, G. A.; CHILLIARD, Y.; DAVICCO, M. J. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 3. Plasma hormones and mammary apparent uptake metabolites. **Journa of Dairy Science**, v.74, p.1893-1903, 1991.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, n.1, p.371-379, 1996.

GARCIA, J. M.; PINHEIRO, L. E. L.; OKUDA, H. T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **ARS Veterinária**, v.3, n.1, p.47-53, 1987.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEM, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; NIZIELSKI, S. E.; WILLIAMS, G. L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, n.8, p.2158-2167, 2002.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ESTEO, M. C.; SOLER, A. J. Heterologous *in vitro* fertilization is good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.71, p.643-650, 2009.

GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M. H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v.74, p.1548-1558, 2010.

GHOREISHI, S. M.; ZAMIRI, M. J.; ROWGHANI, E.; HEJAZI, H. Effect of a calcium soap of fatty acids on reproductive characteristics and lactation performance of fat-tailed sheep. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, p.2389-2395, 2007.

GIFFIN, J. L.; BARTLEWSKI, P. M.; HAHNEL, A. C. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. **Experimental Biology and Medicine**, v.239, p.1606-1618, 2014. doi:10.1177/1535370214543063.

GIFFIN, J. L.; FRANKS, S. E.; RODRIGUEZ-SOSA, J. R.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P. M. A study of morphological and haemodynamic determinants of

testicular echotexture characteristics in the ram. **Experimental Biology and Medicine**, London, v.234, n.7, p.794–801, 2009.

GIL, J., JANUSKAUSKAS, A., HAARD, M. C. H.; HÅÅRD, M. G. M.; JOHANISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MÁRTINEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, n.2, p.69-77, 2000.

GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445–457, 2005.

GOMES, R. C. **Metabolismo Proteico, composição corporal, características de carcaça e qualidade de carne de novilhos Nelore (*Bos indicus*) em função de seu consumo alimentar residual**. 2009. 93 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de Sao Paulo, Pirassununga, 2009.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. de; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; DA COSTA, L. F. S. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap.14, p.261- 291.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2008. 408 p.

GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.30-65.

GOULETSOU, P. G.; FTHENAKIS, G. C. Clinical evaluation of reproductive ability of rams. **Small Ruminant Research**, v.92, n.1-3, p.45–51, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.005>>.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

GREGORY, K. E.; LUNSTRA, D. D.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for puberty and scrotal traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2795-2807, 1991.

GRUMMER, R. R.; CARROL, D. J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.3838-3852, 1991.

GUIMARÃES, J. D. **Avaliação andrológica, estudo qualitativo e quantitativo da espermatogênese de touros mestiços F1 Holandês x Zebu e Red Angus x Zebu**. 1997. 136f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GULIA, S., SARKAR, M.; KUMAR, V.; MEYER, H. H.; PRAKASH, B. S. Divergent development of testosterone secretion in male zebu (*Bos indicus*) and crossbred cattle (*Bos indicus* × *Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) during growth. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1143-1148, 2010.

GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. **International Review of Cytology**, v.199, p.1-64, 2000.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7^a ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.

HAFLA, A. N.; LANCASTER, P. A.; CARSTENS, G. E.; FORREST, D. W.; FOX, J. T.; FORBES, T. D.; DAVIS, M. E.; RANDEL, R. D.; HOLLAWAY, J. W. Relationships between feed efficiency, scrotal circumference, and semen quality traits in yearling bulls. **Journal of Animal Science**, v.90, p.3937-3944, 2012.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v.65, p.1122-1136, 2006.

HAMILTON, T. Maximizing Beef Bull Fertility and Reproduction. **The Cattle Site**. 2007. Disponível em: <<http://www.thecattlesite.com/articles/838/maximizing-beef-bull-fertility-and-reproduction/>>. Acesso em 5 de janeiro de 2017.

HERD, R. M.; ARTHUR, P. F.; HEGARTY, R. S.; ARCHER, J. A. Potencial to reduce greenhouse gas emissions from beef production by selection for reduced residual feed intake. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 7., 2002, Institut National de la Recherche Agronomique, France. **Proceedings...** Montpellier, 2002. (CD-ROM).

HERD, R. M.; ODDY, V. H.; RICHARDSON, E. C. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.423-430, 2004.

HERNÁNDEZ, M. M. R.; PATINO, H. O.; GREGORY, R. M.; ANGEL, J. C.; RE del, D.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados e qualidade seminal pré e pós-congelamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.49, n.6, p.471-479, 2012.

HIGHTSHOE, R. B.; COCHRAN, R. C.; CORAH, L. R.; KIRACOFÉ, G. H.; HARMON, D. L.; PERRY, R. C. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4097-4103, 1991.

HOCQUETTE, J. F.; ORTIGUES-MARTY, I.; PETHICK D.; HERPIN, P.; FERNANDEZ, X.; Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in

skeletal muscle of meta-production animals. **Livestock Production Science**, v.56, p.115-143, 1998. doi:10.1016/S0301-6226(98)00187-0.

HOLT, C.; HOLT, W. V.; MOORE, H. D.; REED, H. C.; CURNOCK, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, v.18, n.3, p.312-323, 1997.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000.

HWANG, W. S.; LEE, K. N.; KIM, J. T.; ROH, S.; PARK, J. I.; LE, B. C. Studies on the use of computer aided semen analysis (CASA) technology for fertility prediction in Korean native cattle. **Theriogenology**, v.51, p.345, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.17, n.39, p.1-8, 2002.

JEDRASZCZYK, J. Ultrasonography technique in bull reproductive organ examination. **Medcyna Weterynaryna**, v.59, n.4, p.311-314, 2004.

JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.5, p.978, 1984.

JENKIS, T. C.; JENNY, B. F. Effects of hydrogenated fat intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **Journa of Dairy Science**, v.72, p.2316-2324, 1989.

JOHNSON, A.D. Sample preparation and chemical analysis of vegetation. In: MANEJTE, L.T. (Ed.). **Measurement of grassland vegetation and animal production**. Aberystwyth: Commonwealth Agricultural Bureau, p.96-102, 1978.

JUCÁ, A. F.; ANDRADE MOURA, J. C.; GUSMÃO, A. L.; BITTENCOURT, T. C.; NASCIMENTO, M. C.; BARBOSA, C. M. P. Avaliação ultrassonográfica dos testículos e das glândulas sexuais anexas de carneiros Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.650-659, 2009.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals** / editors, Jiro Jerry Kaneko, John W. Harvey, Michael L. Bruss. —6th ed. 2008. p.904.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C. D.; NEBEL, R. L.; CASSELL, B. G. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, v.67, p.1004-1012, 2007.

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

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

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

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.368–373, 2008.

KEALY, J. K.; MCALLISTER, H. A. **Radiologia e ultrassonografia do cão e do gato**. 3^a ed. São Paulo: Editora Manole, 2005. p.7-18.

KELLY, A. K., MCGEE M, CREWS D. H. JR, SWEENEY T, BOLAND, T. M.; KENNY, D.A. Repeatability of feed efficiency, carcass ultrasound, feeding behavior, and blood metabolic variables in finishing heifers divergently selected for residual feed intake. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3214–3225, 2010.

KELLY, A. K.; MCGEE, M.; CREWS, D. H. Jr; LYNCH, C. O.; WUYLIE, A. R.; EVANS, R. D.; KELLY, A. K. Relationship between body measurements, metabolic hormones, metabolites and residual feed intake in performance tested pedigree beef bulls. **Livestock Science**, v.135, p.8 -16, 2011.

KELLY, A. K.; MCGEE, M.; CREWS, D. H.; FAHEY, Jr. A. G.; WYLIE A. R.; KENNY, D. A. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.88, p.109-123, 2009.

KENNEDY, B. W.; VAN DER WERF, J. H. J.; MEUWISSEN, T. H. E. Genetic and statistical properties of residual feed intake. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.71, p.3239-3250, 1993.

KERR, M. G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinaria**. 2. ed. Sao Paulo: Roca, 2003. p. 61- 80.

KIMURA, F.T.; MILLER, V.L. Improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.5, n.3, p.216, 1957.

KNOBIL E, NEILL J. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988, p.975-998.

KOCH, R.M.; SWIGER, L.A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K.E. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.22, p.486-494, 1963.

KÖNIG, H. E.; KIEBICH, H. G. Órgãos genitais masculinos. In: KÖNIG, H. E.; KIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed. p. 427-437, 2011.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis conjugated dieno and total trans fatty acids. **Lipids**, v.32, p.1219-1228, 1997.

KRAUSE, W. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. **International Journal of Andrology**, v.18, p.32-35, 1995.

KUMAR S.; MILLAR J. D.; WATSON P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

KUTZLER, M.; TYSON, R.; GRIMES, M.; TIMM, K. Determination of testicular blood flow in camelids using vascular casting and color pulsed-wave Doppler ultrasonography. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.1-7, 2011.

LABTEST. **kit Glicose Liquiform VET**. Labtest, Diagnóstica S. A. Brasil. Disponível em: <<https://labtest.com.br/reagentes/glicose-liquiform-vet/>> , visto em 17/04/2017.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científicas Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.4, p.279-286, 2011.

LEITE, T. G.; VALE FILHO, V. R.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; EMERICK, L. L.; ZAFFALON, F. G.; MARTINS, J. A. M.; ANDRADE, V. J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.31-38, 2010.

LICITRA, G., HERNÁNDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science Technology**, v.57, p.347-358, 1996.

LOVE, C. C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.39-45, 2005.

LUNSTRA, D. D., ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 638-648, 1982.

LUNSTRA, D. D.; FORD, J. J.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, v.46, p.1054-1066, 1978.

MACHADO, L. A. Z.; FABRÍCIO, A. C.; ASSIS, P. G. G.; MARASCHIN, G. E. Estrutura do dossel em pastagem de capim-marandu submetidas a quatro ofertas de lâminas foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1495-1501, 2007.

MAIA, M. A. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGO, I. C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.118-123, 2010.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109–119, 2002.

MARSHBURN, P. B.; MCINTIRE, D.; CARR, B. R.; BYRD, W.; Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, v.58, n.1, p.179-186, 1992.

MARTIN, G. B.; TJONDRONEGORO, S.; BLACKBERRY, M. A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotropins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, n.1, p.121-128, 1994.

MARTIN, L. C.; BRINKS, J. C.; BOURDON, R. M.; CUNDIFF, L. V. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal of Animal Science**, v.70, p.4006-4014, 1992.

MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.B. Estimates of genetic correlations between sire scrotal circumference and offspring age at first calving in Nelore cattle (short communication). **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.209-212, 1991.

MARTINS, L. F. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Parda Alpina**. Escola de Veterinária – Departamento de Veterinária - UFV Viçosa – MG, 2001 Dissertação (Mestrado em Veterinária área de concentração em reprodução animal).

MATÁS, C., SANSEGUNDO, M., RUIZ, S., GARCÍA-VÁZQUEZ, F., GADEA, J., ROMAR, R., COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration. **Theriogenology**, v. 74, p. 1327–1340, 2010.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Physiological Society**, v.247, p.125-142, 1984.

McMENIMAN, N. P. Methods of estimating intake of grazing animals. In: SIMPÓSIO SOBRE TÓPICOS ESPECIAIS EM ZOOTECNIA. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. p.131-168.

MEIRA, T. B.; MORAES, F. L. de; BÖHME, M. T. S. Relações entre leptina, puberdade e exercício no sexo feminino. Revista **Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n.4, p.306-310, 2009.

MERCADANTE, M. E. Z.; GRION, A. L. **Perspectivas de inclusão da eficiência alimentar em programas de melhoramento genético de bovinos de corte**. Palestra. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 10., 2013, Uberaba. Anais... Uberaba: SBMA, 2013.

MERCADANTE, M. E. Z.; PACKER, I. U.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; FIGUEIREDO, L. A. Direct and correlated responses to selection for yearling weight on reproductive performance of Nelore cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.376-384, 2003.

MERCADANTE, M. E. Z.; RAZOOK, A. G. Programa de melhoramento genético do Instituto de Zootecnia. Sertãozinho, SP. **Bovinocultura de Corte**, v II, 44, p.847-860. FEALQ, Piracicaba, SP, 2010.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.

MEYER, A.M.; KERLEY; M. S.; KALLENBACH, R. L. The effect of residual feed intake classification on forage intake by grazing beef cows. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2670-2679, 2008.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.155-166, 2002.

MILFORD, R., MINSON, D. J. Intake of tropical pasture species. In: CONGRESSO INTERNATIONAL DE PASTAGEM, 9, 1965, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria de Agricultura, p.814-822, 1966.

MINGOTI G, Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. **Tópicos avançados em biotecnologia da reprodução**. Jaboticabal: Funep, 2005. 1 CD-ROM.

MINSON, D. J., MILFORD, R. The voluntary intake and digestibility of diets containing different proportions of legume and mature pangola grass (*Digitaria decumbens*). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.7, n.29, p.546-551, 1967.

MINSON, D.J. **Forage in ruminant nutrition**. San Diego: Academic Press. 1990, 483p.

MOHAN, M.; RYDER, S.; CLAYPOOL, P. L.; GEISERT, R. D.; MALAYER, J. R. Analysis of Gene Expression in the Bovine Blastocyst Produced *In vitro* Using Suppression- Subtractive Hybridization. **Biology of Reproduction**, v.67, p.447-453, 2002.

MOLAN, L. K. **Estrutura do dossel, interceptação luminosa e acúmulo de forragem em pastos de capim-Marandu submetidos a alturas de pastejo por meio de lotação contínua**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004. 180p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

MORAES, E. H. B. K.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; MORAES, K. A. K.; DETMANN, E.; SOUZA, M. G. Avaliação nutricional de estratégias de suplementação para bovinos de corte durante a estação da seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.608-616, 2010.

MORELLI, M. **Eficiência de utilização de alimentos em machos Nelore classificados para consumo alimentar residual**. 2015. 66p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Produção Animal Sustentável. Nova Odessa, 2015.

MOSES, D. F.; LAS HERAS, M. A. de; VALCÁRCEL, A.; PÉREZ, L.; BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **First International Journal of Andrology**, v.27, p.25-29, 1995. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1995.tb02091.x

MOURA, A. A. A.; RODRIGUES, G. C.; FILHO, R. M. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterone e características de abate em touros da raça nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.934-943, 2002.

MOURA, A.; ERICKSON, B. H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cells in beef bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.111, p.183-190, 1997.

NAIR, S.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.21-29, 2006.

NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; ABE, S. I. IGF-I, IGF-II and Insulin Promote Differentiation of Spermatogonia to Primary Spermatocytes in Organ Culture of Newt Testes. **International of Journal Developmental Biology**, v.43, p.343-347, 1999.

NASCIMENTO, C. F.; BRANCO, R. H.; BONILHA, S. F. M.; CYRILLO, J. N. S. G.; NEGRÃO, J. A.; MERCADANTE, M. E. Z. Residual feed intake and blood variables in young Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.93, p.1318-1326, 2015.

NEPOMUCENO, A. C.; CANOLA, J. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; AVANTE, M. L. Princípios físicos da ultrassonografia e aplicações na reprodução animal. In: FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. **Ultrassonografia na reprodução animal**. São Paulo: MedVet, 2013. p. 6.

NICHI, M.; BOLS, P. E.; ZUGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N.; Seasonal variation in semen quality in Bos

indicus and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v.66, p.822-828, 2006.

NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB J. A., PRICE, M. A.; WANG, Z; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, p.145-153, 2006.

NOAKES, E. D.; PARKINSON, J. T.; ENGLAND, G. C. W. Fertility and infertility in male animals. In: ENGLAND, G. C. W.; ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J. (Ed.). ARTHUR'S: **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 8^a ed. Philadelphia: Saunders, p. 695–750, 2001.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.361–372, 2004.

NOLAN, C. J.; NEUENDORFF, D. A.; GODFREY, R. W.; HARMS, P. G.; WELSH JR, T. H.; McARTHUR, N. H.; RANDEL, R. D. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of brahman bulls. **Journal of Animal Science**, v.6, n.8, p.1987-1996, 1990.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Nutrients requirements of sheep**. Washington: National Academies Press, 362 p, 2007.

NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th edition, National Academies Press, Washington D. C, 2000.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S.; HERRGESELL, E. J.; WISNER, E. R. Princípios físicos, instrumentação e segurança do diagnóstico por ultrassom. In: NYLAND, T. G.; MATTON, J. S. **Ultrassom diagnóstico em pequenos animais**. 2^a ed. São Paulo:Roca, 2004. p.1-9.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N. SANTOS, R. M. S.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MONTEIRO, F. M.; LIMA, V. F. M. H. Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**. v.137, p.145-155, 2013.

OLIVEIRA, M. E. F.; DIAS, L. M. K.; FELICIANO, M. A. R. Ultrassonografia do Sistema Reprodutor Masculino de Pequenos Ruminantes. In: FELICIAN, M. A.; OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. (Ed.). **Ultrassonografia na reprodução animal**. São Paulo: MedVet, 2013. 161-176p.

OLIVEIRA, M. E. F.; SILVA, J. C. B. Andrologia. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: MedVet, 2013. p.40-50.

ORR, C.; HUTCHESON, D. P.; CUMMINS, J. M.; THOMPSON, G. B. Nitrogen kinetics of infectious bovine rhinotracheitis stressed calves. **Journal of Animal Science**, v.66, p.1982-1989, 1988.

PALMA, G. A.; MICELI, D. Interacción Funcional entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra. In: PALMA, G. A. **Biotechnología de la reproducción**. 2ª ed. Mar del Plata: Pugliese y Siena, 2008. p.93-134.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídios. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, 2011, p.287-310.

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, p.39-44, 2000.

PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.30, n.1, p.112, 1984. Abstract.

PASTORE, A. A.; TONIOLLO, G. H.; CARDILLI, D. J.; CANOLA, J. C.; MERCADANTE, M. E. Z. Contribuição da ultrassonografia na avaliação andrológica de bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, p.32-40, 2015.

PAYNE, J. M., PAYNE, S. **The Metabolic Profile Test**. Oxford University Press. New York, 1987.

PECHMAN, R. D.; EILTS, B. E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**, v.27, n.2, p.431-441, 1987.

PEIXOTO, L. A. O.; OSORIO, M. T. M. Perfil metabólico protéico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p.299-304, 2007.

PENNY, P. C.; NOBLE, R. C.; MALDJIAN, A.; CEROLINI, S. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. **Pig News and Information**, v.21, n.4, p.119-126, 2000.

PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PORTA, P. V.; BESSA, R. J. B.; MARQUES, C. C. Post-thawing resistance of bovine embryos is improved by *trans-10;cis-12conjugated* linoleic acid (CLA). **Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, Bahia, Brasil, 2004.

PÉREZ, E. P. **Method of production calcium, sodium or magnesium soaps from fatty acids or oleins from animal or vegetable fats and use thereof as nutrients in monogastric animal feed**. Patente N° US20090220638A1. Madrid, Espanha, 2005.

PETER, SURAI.; RAYMOND, C. N. **Male fertility with antioxidants and/or polyunsaturated fatty acids**. Patente N° 6235783. United States, 2001.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 10^a ed.: Lea e Febiger, Philadelphia. 1993. p.769-789.

PINGGERA, G. M.; MITTERBERGER, M.; BARTSCH, G.; STRASSER, H.; GRADL, J.; AIGNER, F.; PALLWEIN, L.; FRAUSCHER, F. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. **BJU International**, v.101, p.722–726. 2008.

POST, T. B.; CHRISTENSEN, H. R.; SEIFERT, G. W. Reproductive performance and productive in beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. **Theriogenology**, v.27, n.2, p.317-328, 1987.

POULOS, A.; SHARP, P.; JOHNSON, D.; WHITE, I.; FELLENERGET, A. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. **Biochemical Journal**, v.240, n.3, p.895-891, 1986.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.

RASUL, Z., AHMAD, N., ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrossome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.22, n.2, p.278-83, 2001.

RAWLINGS, N. C.; HAFS, H. D.; SWANSON, L. W. Testicular and blood plasma androgens in Holstein bulls from birth through puberty. **Journal of Animal Science**, v.34, p.435-440, 1972.

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

RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A.; BONILHA NETO, L. M.; TROVO, J. B. F.; PACKER, I. U.; PACOLA, L. J.; CYRILLO, J. N. S. G.; RUGGIERI, A. C.; MERCADANTE, M. E. Z. Selection for yearling weight in Nelore and Guzera zebu breeds: selection applied and response in 15 years of progeny. Proc. 6th World Cong. Genet. **Livestock Production Science**, p.133–136, 1998.

RAZOOK, A. G.; MERCADANTE, M. E. Z. Ganhos de produtividade com o uso de touros provados. In: SANTOS, F. A. P.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. **Requisitos de qualidade na bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2007. p.93-114.

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

RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.441-452, 2004.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais:Palestra... Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8p.CD-ROM. 2005.

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

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v.19, n.1, p.85-91, 2006.

SAACKE, R. G. Relevancia de características del semen compensables y no compensables en la fertilidad y la calidad embrionaria en los bovinos. In: **SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL IRAC**, 8., 2009, Cordoba, Buenos Aires, 2009.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALEM, N. JR.; LITMAN, B.; KIM, H. Y.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v.36, n.9, p.945-59, 2001.

SAMADIAN, F.; TOWHIDI, A.; REZAYAZDI, K.; BAHREINI, M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. **Animal**, v.4, p.2017-2022, 2010.

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

SANTOS, M D.; TORRES, C. A. T.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; FONSECA, F. A. Perfil de Testosterona e Metabólitos Lipídicos de Touros Zebu Alimentados com dois Níveis de Concentrado e Lipídeos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.3, p.620-626, 1998.

SARGISON, N. D. **Sheep flock health: a planned approach**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008. 465 p.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.197-204, 2007.

SCHALLENBERGER, E.; HARTL, P.; SCHAMS, D.; LORRMANN, W.; HAHN, R. **Hormone profiles and fertility in bulls**. v.43, p.402-403, 1991.

SCHAUFF, D. J.; CLARK J. H. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2990-3002, 1992.

SCHENKEL, F. S.; DEVITT, C. J. B.; WILTON, J. W.; MILLER, S. P.; JAMROZIK, J. Random regression analyses of feed intake of individually tested beef steers. **Livestock Production Science**, v.88, p.129-142, 2004.

SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; WILTON, J. W. Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth, and body composition traits of young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science**, v.84, p.177-185, 2004.

SCHMIDT-HEBBEL, J.; TONIOLLO, G. H.; LEITE, F. G.; FERRAUDO, A. S.; PERECIN, D.; PACOAL, L. J. Características físicas e morfológicas de sêmen de touros jovens das raças Gir, Guzerá, Nelore (*Bos taurus indicus*) e Caracu (*Bos taurus taurus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.461-467, 2000.

SCHURICH, M.; AIGNER, F.; FRAUSCHER, F.; PALLWEIN, L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.144, suppl.1, p.192-198, 2009.

SELVARAJU, S.; RAJU, P.; RAGHAVENDRA, S.; NANDI, S.; DINESHKUMAR, D.; THAYAKUMAR, A.; PARTHIPAN, S.; RAVINDRA, J. P. Evaluation of maize grain and polyunsaturated fatty acid (PUFA) as energy sources for breeding rams based on hormonal, sperm functional parameters and fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.669-678, 2012.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, s.3, p.20-26, 2015.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.78-86, 1996.

SILVA, M. R. **Taxa de gestação e avaliação de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore utilizando testes convencionais e de adesão in vitro de espermatozoides à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos**. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Vicosa - UFV - Vicosa, 2000.

SMITH, A. M.; REID, J. T. Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. **Journal of Dairy Science**, v.38, n.5, p.515-524, 1955.

SMITH, S. N.; DAVIS, M. E.; LOERCH, S. C. Residual feed intake of Angus beef cattle divergently selected for feed conversion ratio. **Livestock Science**, v.132, p.41-47, 2010.

SNOWDER, G. D.; STELLFLUG, J. N.; VAN VLECK, L. D. Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, n.6, p.1508-1511, 2002.

SOBRINHO, T.L.; BRANCO, R.H.; BONILHA, S.F.M.; CASTILHOS, A.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; MERCADANTE, M.E.Z. Residual feed intake and relationships with performance of Nelore cattle selected for post weaning weight. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.929-937, 2011.

SREENAN, J. M.; SCANLON, P. F. Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. **Nature**, v.217, p.867, 1968.

STEYN, Y.; VAN MARLE-KOSTER, E.; THERON, H. E. Residual feed intake as selection tool in South African Bonsmara cattle. **Livestock Science**, v.164, p.35–38, 2014.

STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; LECEWICZ, M.; Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reproductive Biology**, v.4, p.271-287, 2004.

SUDANO, M. J.; CRESPILO, A. M.; FERNANDES, C. B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F. O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIN-ALVARENGA, F. Use of Bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in zebu bulls. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.1-6, 2011. Article ID 436381. doi: 10.4061/2011/436381.

TALAVERA, F., PARK, C. S., WILLIAMS, G. L. Relationship among dietary lipid intake serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. **Journal of Animal Science**, v.60, n.4, p.1045-1051. 1985.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organell e function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

TITGEMEYER, E.C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D.J. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **Journal of Animal Science**, v.79, n.4, p.1059-1063, 2001.

TOMLINSON, M.; JENNINGS, A.; MACRAE, A.; TRUYERS, I. The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. **Theriogenology**, v.89, p.169–177, 2017.

TREVISAN, N. **Relação do consumo alimentar residual com desempenho, parâmetros metabólicos e crescimento de bovinos Nelore**. 2016, 57p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável. Nova Odessa, 2016.

TROCÓNIZ, J. F.; BELTRÁN, J.; BASTIDAS, H.; LARREAL, H.; BASTIDAS, P. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nelore bulls. **Theriogenology**, v.35, p.815-826, 1991.

UAUY, R.; CASTILLO, C. Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. **Journal of Nutrition**, v.133, n.9, p.2962S-72S, 2003.

VALE FILHO, V. R.; FONSECA, V. O.; FRENEAU, G. E. Desenvolvimento testicular e maturidade sexual em bovinos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.8, p.63-75, 1993.

VALENTE, T. N. P.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; VALADARES FILHO, S. C.; GOMES, D. I.; FIGUEIRAS, J. F. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.11, p.2565-2573, 2011

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University, Ithaca. 1985.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583 - 3597, 1991.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

VAN TILBURG, M. F.; SILVA, J. F. S.; DIAS, A. J. B.; QUIRINO, C. R. E.; FAGUNDES, B. Influência da Insulina na Congelabilidade do Sêmen de Ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.731-739, 2008.

VÁSQUEZ, L.; VERA, O.; ARANGO, J. Testicular growth and semen quality in peripuberty Brahman bulls. **Livestock Research for Rural Development**, v.15, n.10, 2003.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIANNA, F. P.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; MELO, C. M.; DELL'AQUA JR, J. A. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.279-282, 2009.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

VOLP, A. C. P., REZENDE F. A. C.; ALFENAS R. C. G. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v.23, n.2, p.158-64. 2008.

VOSS, A.; REINHART, M.; SANKARAPPA, S.; SPRECHER, H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, n30, p.19995-20000, 1991.

WAGNER, J. J.; LUSBY, K. S.; OLTJEN, J. W.; RAKESTRAW, J.; WETTEMANN, R. P.; WALTERS, L. E. Carcass composition in mature hereford cows: Estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 3, p. 603-612, 1988.

WALDNER, C. L., KENNEDY, R. I.; PALMER, C. W. A description of the findings from bull breeding soundness evaluations and their association with pregnancy outcomes in a study of western Canadian beef herds. **Theriogenology**. 2010. doi:10.1016/j.theriogenology. 2010.04.012.

WANG, Z.; COLAZO, M. G.; BASARAB, J. A.; GOONEWARDENE, L. A.; AMBROSE, D. J.; MARQUES, E.; PLASTOW, G.; MILLER, S. P.; MOORE, S. S. Impact of selection for residual feed intake on breeding soundness and reproductive performance of bulls on pastured-based multi-sire mating. **Journal of Animal Science**, v.90, p.2963-2969, 2012.

WATERMAN, M. R.; KEENEY, D. S. Os genes envolvidos na biossíntese de andrógenos eo fenótipo masculino. **Hormone Research**, v.38, n.5-6, p.217-221, 1992. PMID1307739. doi : 10,1159 / 000182546.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R.; AITKEN, R. J. Mini review: polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77, n.2, p.190-201, 2007.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assesement of their post thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WEST, J. W.; HILL, G. M. Effect of a protected fat product on productivity of lactating Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.3200. 1990.

WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v. 44, n. 3, p. 413-422, 1995.

WILLIAMS, G. L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v.67, n.3, p.785-793. 1989.

WITTWER, F. Empleo de los perfiles metabólicos en el diagnostico de desbalances metabólicos nutricionales en el ganado. **Buiatria**, v. 2, p. 16-20, 1995.

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

WOOD, M. M.; ROMINE, L. E.; LEE, Y. K.; RICHMAN, K. M.; O'BOYLE, M. K.; PAZ, D. A.; CHU, P. K.; PRETORIUS, D. H. Spectral Doppler signatures waveforms in ultrasonography. **Ultrasound Quartely**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 283-299, 2010.

ZELLI, R.; TROISI, A.; ELAD NGONPUT, A.; CARDINALI, L.; POLISCA, A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.632-637, 2013.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N.; HAARD, M. G. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bull entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 166–185, 2005.

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Cell and Developmental Biology**, v.9, p.417-421, 1998.

9. Anexos

Anexo 1: Intervalo de referência do laboratório de patologia clínica veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - UNESP Jaboticabal.

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA - HOSPITAL VETERINÁRIO "Governador Laudo Natel" - UNESP - Jaboticabal

VALORES DE REFERÊNCIA												
ESPÉCIE	PARAMETROS ERITROLEUCOMÉTRICOS E PLAQUETÁRIOS											
	HE	LE	HB	HT	CONTAGEM DIFERENCIAL %						PLAQUETAS.	
	x10 ⁹ /uL	x10 ⁹ /uL	g/dL	%	BAS.	EOS.	BAST.	SEG.	LINF.	MON.	x10 ⁹ /uL	
CANINA	5,5 - 8,5	6 - 18	12 - 18	37 - 55	00 - 01	2 - 10	0 - 3	60 - 77	13 - 30	3 - 10	180 - 400	
FELINA	6,6 - 10	8 - 26	8 - 14	24 - 46	0 - 1	2 - 12	0 - 3	36 - 76	20 - 66	1 - 4	200 - 600	
BOVINA	5,0 - 10	4 - 12	8 - 14	24 - 48	0 - 2	2 - 20	0 - 2	15 - 45	45 - 75	2 - 7	200 - 600	
EQUINA	7,0 - 13	7 - 14	10 - 18	32 - 55	0 - 3	0,5 - 11	0 - 2	30 - 65	25 - 70	1 - 7	200 - 600	
OVINA	8,0 - 16	4 - 12	8 - 16	24 - 50	0 - 3	1 - 10	0 - 2	10 - 50	40 - 75	1 - 6	200 - 700	
CAPRINA	12 - 20	6 - 16	8 - 14	24 - 48	0 - 2	3 - 8	0 - 2	30 - 48	50 - 70	1 - 4	200 - 800	
SUINA	5,0 - 8,0	11 - 12	10 - 16	32 - 50	0 - 2	0,5 - 11	0 - 4	28 - 47	39 - 62	2 - 10	200 - 800	
	FORMULA LEUCOCITÁRIA ABSOLUTA (x10 ⁹ /uL)											
	VGM	HGM	CHGM	RETIC.								
	fL	pg	g/dL	%	BAS.	EOS.	SEG.	BAST.	LINF.	MON.		
CANINA	60 - 77	19 - 23	31 - 34	0,1 - 1,5	0 - 0	0,12 - 1,8	3,6 - 13,8	0 - 0,5	0,72 - 5,4	0,18 - 1,8		
FELINA	39 - 55	13 - 17	31 - 35	0,1 - 1,8	0 - 0	0,16 - 3,0	2,8 - 17,5	0 - 0,7	1,6 - 13,7	0,08 - 1,0		
BOVINA	40 - 60	14 - 18	26 - 34	-	0 - 0,2	0,08 - 2,4	0,6 - 5,4	0 - 0,2	1,8 - 9,0	0,08 - 0,8		
EQUINA	37 - 52	15 - 19	31 - 35	-	0 - 0,3	0,03 - 1,5	2,1 - 9,0	0 - 0,2	1,75 - 9,8	0,03 - 0,9		
OVINA	23 - 48	09 - 13	29 - 35	-	0 - 0,3	0,04 - 1,2	0,4 - 6,0	0 - 0,2	1,6 - 9,0	0,04 - 0,7		
CAPRINA	10 - 37	05 - 08	30 - 35	-	0 - 0,3	0,18 - 1,3	1,8 - 7,6	0 - 0,3	3,0 - 11,2	0,06 - 0,6		
SUINA	50 - 68	16 - 22	30 - 34	0,1 - 1,6	0 - 0,4	0,05 - 2,4	3,0 - 10,3	0 - 0,8	4,3 - 13,6	0,22 - 2,2		
	PARAMETROS BIOQUÍMICOS											
	URÉIA	CREA	SÓDIO	POTÁS.	PT	ALB.	COLEST	FIBR.	BIL. D.	BIL. T	AST	LIPASE
	mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	g/dL	g/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L
CANINA	15 - 65	0,5 - 1,5	146 - 166	3,8 - 5,1	5,8 - 7,9	2,6 - 4,0	125 - 270	125 - 300	0,06 - 0,12	0,1 - 0,5	10 - 88	27 - 750
FELINA	32 - 75	0,8 - 2,0	151 - 161	3,5 - 5,1	6,1 - 8,8	2,6 - 4,3	90 - 205	100 - 400	0,05 - 0,50	0,1 - 0,5	10 - 88	25 - 750
BOVINA	12 - 65	0,8 - 1,4	138 - 148	3,8 - 5,1	6,3 - 8,9	2,8 - 3,8	80 - 180	200 - 500	0,04 - 0,40	0,0 - 0,50	78 - 132	-
EQUINA	21 - 54	0,9 - 1,8	136 - 143	2,6 - 4,0	6,6 - 8,0	3,0 - 4,0	75 - 150	200 - 400	0,0 - 0,40	1,0 - 2,0	226 - 366	-
OVINA	17 - 43	1,0 - 2,7	139 - 152	3,9 - 5,4	6,0 - 7,9	2,4 - 3,0	50 - 140	100 - 500	0,0 - 0,27	0,1 - 0,5	98 - 278	-
CAPRINA	21 - 60	0,9 - 1,8	135 - 154	4,6 - 9,8	6,4 - 7,8	2,0 - 4,4	50 - 140	100 - 500	0,0 - 0,27	0,0 - 0,1	98 - 278	-
SUINA	17 - 65	1,0 - 3,0	135 - 150	7,8 - 10,6	7,4 - 8,9	2,0 - 3,9	36 - 154	200 - 400	0,0 - 0,30	0,0 - 0,1	9 - 113	-
	GGT	CALCIO	FOSF.	MAG.	ALT	GLIC.	CK	LDH	F.ALC.	AMIL.	TRIGL.	CLORO
	U/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	mg/dL	U/L	U/L	U/L	U/L	mg/dL	mEq/L
CANINA	1 - 10	8,6 - 11,2	2,2 - 5,5	1,8 - 2,4	10 - 88	60 - 110	20 - 200	50 - 495	20 - 150	300 - 2000	27 - 115	105 - 115
FELINA	1 - 10	8,0 - 10,7	1,8 - 6,4	1,5 - 2,5	10 - 88	70 - 150	50 - 450	75 - 490	10 - 80	500 - 1800	20 - 150	117 - 123
BOVINA	11 - 24	9,7 - 12,4	5,6 - 6,5	1,8 - 2,3	14 - 38	45 - 75	66 - 120	08 - 302	90 - 170	126 - 250	-	97 - 111
EQUINA	4 - 13	11,0 - 13,6	3,1 - 5,6	2,2 - 2,8	34 - 113	75 - 115	86 - 140	162 - 412	143 - 395	35 - 100	-	99 - 109
OVINA	-	10,0 - 12,0	6,0 - 7,2	2,2 - 2,8	80 - 84	60 - 80	-	80 - 111	68 - 387	-	35 - 100	98 - 116
CAPRINA	-	10,0 - 13,0	5,5 - 6,5	2,8 - 3,6	60 - 84	50 - 80	-	60 - 111	68 - 387	-	35 - 100	98 - 115
SUINA	-	8,0 - 12,0	5,3 - 9,6	2,7 - 3,7	32 - 84	65 - 95	-	96 - 160	26 - 362	-	-	98 - 115

Anexo 2: Ficha técnica utilizada nas colheitas de andrológico.

Ficha Técnica - Doutorado Guilherme IZ

DATA: _____

HORA: _____

Número: _____

Idade: _____

→ Exame Andrológico:

Estado Geral:	
Temperatura:	Testículo: (); Corporal ()
Dentes:	
Aprumos e membros:	
Testículos:	
Perímetro Escrotal:	PE ()
Comprimento testicular:	TD () x () TE () x ()
Volume testicular:	
Formato testicular:	Longo (), Longo-moderado (), longo-ovóide (), ovóide esférico ()
Tônus testicular:	1 (), 2 (), 3 (), 4 (), 5 ()
Epidídimo:	
Pênis:	
Órgãos internos:	Glândula Vesicular: 1 (), 2 (), 3 ()
Comportamento sexual:	
Observações:	

Espermograma

Método de colheita:	
Número estímulos:	
Volume do ejaculado (ml):	
pH:	
Cor:	
Motilidade (%):	
Turbilhamento (0 - 5):	
Concentração (x 10 ⁶ /ml):	
[] MINITUBE	
Vigor (0 - 5):	
Observações:	

Características morfológicas (%)	()	() sptz contados
DEFEITOS MAIORES (%)		PATOLOGIA DE CAUDA:
Acrossoma: ()		Fortemente dobrada ou enrolada: ()
Gota protoplasmática proximal: ()		Dobrada com gota prot. distal: ()
PATOLOGIA DE CABEÇA:		Total de defeitos maiores: ()
Subdesenvolvido: ()		
Cauda enrolada na cabeça: ()		DEFEITOS MENORES (%)
Cabeça isolada patológica: ()		Delgado: ()
Estreito na base: ()		Gigante e largo: ()
Piriforme: ()		Curto e pequeno normal: ()
Pequeno anormal: ()		Isolado normal: ()
Coloração anormal: ()		Abaxial, retroaxial, obliquo: ()
Contorno anormal: ()		Cauda dobrada ou enrolada: ()
Pouch formation: ()		Gota protoplasmática distal: ()
Formas teratológicas: ()		Total de defeitos menores: ()
PATOLOGIA DE PEÇA INTERMEDIÁRIA (fibrilação, edema, pseudogotas, outras) ()		DEFEITOS TOTAIS: ()
Agnesia de peça intermediária: ()		
NORMAIS ()		OUTROS ELEMENTOS: Células gigantes, células primordiais, medusas, leucócitos e hemácias: ()

Anexo 3. Configuração do software Hamilton Thorne Biosciences (IVOS - Ultimate 12) para avaliar a cinética de espermatozoides bovinos.

PARÂMETROS	CONFIGURAÇÕES
Taxa de aquisição de imagens (Hz)	30
Imagens adquiridas por campo (no.)	30
Contraste mínimo da célula	60
Tamanho mínimo da célula (pixels)	6
Velocidade de trajeto (VAP) mínimo de células progressivas (m/s)	40
Retilinearidade (%)	70
Valor de corte VAP (m/s)	30
Valor de corte da velocidade retilínea (VSL, m/s)	20
Ampliação	1,92 x
Frequência de vídeo (Hz)	60
Intensidade da iluminação	2193
Temperatura	38°C
Tipo de câmara	Makler

Anexo 4. Composição do formol salina tamponado utilizado para análise da morfologia dos espermatozoides.

Formol Salina tamponada		
Ítem	Ingrediente	Quantidade
1	Solução Tamponada STOCK*	100 ml
2	Solução de NaCl STOCK [#]	150 ml
3	Formalina (Formol 37 %)	62,5 ml
4	H ₂ O destilada q.s.p.	500 ml
<hr/>		
1	<u>Solução Tamponada STOCK*</u>	
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	21,25 g
	H ₂ O destilada q.s.p.	500 ml
		100 ml
	KH ₂ PO ₄	22,25 g
	H ₂ O destilada q.s.p.	500 ml
		40 ml
<hr/>		
2	<u>Solução de NaCl STOCK[#]</u>	
	NaCl	9,01 g
	H ₂ O destilada q.s.p.	500 ml
<hr/>		

q.s.p. = quantidade suficiente para