

1 **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
2 **CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
3 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
4  
5  
6  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17 **ESPERMATOGÊNESE EM RUMINANTES**  
18 **SUPLEMENTADOS COM FONTES ALTERNATIVAS DE**  
19 **ALIMENTOS**  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

34 **Diego Silva Macedo**  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 **CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**  
49 **2021**

1 **ESPERMATOGÊNESE EM RUMINANTES SUPLEMENTADOS**  
2 **COM FONTES ALTERNATIVAS DE ALIMENTOS**  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

13 **Diego Silva Macedo**  
14 Bacharel em Biologia  
15 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 Dissertação apresentada ao Colegiado do  
26 Programa de Pós-Graduação em Ciência  
27 Animal da Universidade Federal do Recôncavo  
28 da Bahia, como requisito parcial para a obtenção  
29 do Título de Mestre em Produção e Manejo de  
30 Ruminantes.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 **Orientadora:** Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 **CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**  
53 **2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

|       |  |
|-------|--|
| M141e | <p>Macedo, Diego Silva.<br/>Espermatogênese em ruminantes suplementados com fontes alternativas de alimentos / Diego Silva Macedo. – Cruz das Almas, Bahia, 2021.<br/>59f.; il.</p> <p>Orientadora: Larissa Pires Barbosa.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciência Animal.</p> <p>1.Nutrição de ruminantes-suplementação – Alimentação e rações. 2.Reprodução animal – Ovino – Bovinos. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.20852</p> |
|-------|--|

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

1 **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
2 **CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
3 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

4  
5 **ESPERMATOGÊNESE EM RUMINANTES SUPLEMENTADOS**  
6 **COM FONTES ALTERNATIVAS DE ALIMENTOS**

7  
8 Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de:  
9 Diego Silva Macedo

10  
11 Aprovado em: 9 de março de 2021

12  
13  
14 Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa, UFRB  
15 Presidente

16  
17  
18 Profa. Dra. Ana Lúcia Almeida Santana, UFRB  
19 Examinadora Externa

20  
21  
22 Profa. Dra. Evani Souza de Oliveira Strada, UFRB  
23 Examinadora Externa  
24

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao bom Deus pelo sustento e consolo nos momentos difíceis da vida, além de ser meu porto seguro para recorrer nos momentos de necessidade.

Agradeço também a minha família, que foi extremamente fundamental para essa conquista. Em especial, a meu pai, Nailton e a minha mãe, Ilza, que me proporcionaram todo suporte necessário durante toda minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos, Lucas, Israel, Josué, Jhaidan, Welberte, Igor, Beatriz, Marte e Karine, que foram motivos de muitos risos amenizando a lida da jornada.

Aos colegas de NERA, e também amigos, Laiara, Roberta, Emily, Caene, Taís, Wellber, Ariadne, Polliana, Talita e Léia, que juntos promovem descontração, trazendo graça à pesquisa científica.

Em especial às professoras, Ana Lúcia e Larissa Pires, minha orientadora, que se debruçaram junto a mim na construção desse material.

Novamente à professora Larissa, por tudo que fez e é, não só para mim mas para todo orientado (a) seu (a), pela excelente orientadora que é, pela pessoa descontraída e cheia de graça, que sem dúvida marcou a vida acadêmica de muita gente.

Meu muito obrigado a todos, por essa conquista coletiva!

## 1                   **ESPERMATOGÊNESE EM RUMINANTES SUPLEMENTADOS COM** 2                   **FONTES ALTERNATIVAS DE ALIMENTOS**

3  
4  
5   **RESUMO:** O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com  
6 farelo de cacau e glicerina bruta de baixa pureza, sobre o processo  
7 espermatogênico em ovinos e bovinos, respectivamente. Para isso, 25 ovinos  
8 foram divididos em quatro tratamentos (0, 10, 20 e 30% de farelo de cacau no  
9 concentrado) e suplementados por 150 dias, e 29 bovinos foram divididos em  
10 cinco tratamentos (0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina bruta de baixa pureza no  
11 concentrado), suplementados por 88 dias. Após o período de suplementação os  
12 animais foram encaminhados ao abate em frigoríficos inspecionado, e tiveram  
13 seus testículos coletados para mensurações e preparação de lâminas  
14 histológicas, para determinações de parâmetros de morfometria testicular:  
15 quantificação dos tipos celulares do epitélio seminífero, rendimento intrínseco da  
16 espermatogênese, índices de células de Sertoli, número total de células de  
17 Sertoli (NTCS), NTCS por grama testicular, produção espermática diária (PED),  
18 PED por grama testicular, reserva espermática testicular (RET) e RET por grama  
19 testicular. Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de  
20 Shapiro-Wilk. As variáveis que atenderam aos pressupostos da normalidade,  
21 foram submetidas a Análise de Variância, Teste de Regressão e Teste de  
22 Dunnett. Aquelas que não atenderam, foram submetidas ao Teste de Kruskal-  
23 Wallis. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as análises. O farelo  
24 de cacau no concentrado de ovinos não alterou a população das células do  
25 epitélio germinativo ( $P>0,05$ ), exceto o número de espermatogônias tipo A que  
26 foi menor no grupo controle comparado ao grupo que recebeu 20% ( $P<0,05$ ).  
27 Também houve diferença na relação entre espermatogônias tipo A e  
28 espermatócitos primários em pré-leptóteno, e entre células de Sertoli e  
29 espermatócito primário em leptóteno ( $P<0,05$ ), com o controle maior que grupo  
30 que recebeu 10%. Houve comportamento quadrático negativo para as variáveis  
31 NTCS, PED e RET ( $P<0,05$ ), sendo sugerida, pelo teste de regressão, as  
32 concentrações de 12,27%, 12,45% e 12,45%, respectivamente. A utilização de  
33 9% de glicerina bruta de baixa pureza na dieta de touros aumentou o número de  
34 espermatócitos primários em pré-leptóteno, em paquíteno e de espermátides  
35 arredondadas ( $P<0,05$ ). Não houve efeito da glicerina na dieta de touros para o  
36 rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de células de Sertoli  
37 ( $P>0,05$ ). Apenas a produção espermática diária por grama testicular de touros  
38 sofreu efeito positivo da suplementação com 9% de glicerina ( $P<0,05$ ). A  
39 suplementação com farelo de cacau até o nível de 12,27% no concentrado  
40 melhorou o NTCS e em até 12,45% o PED e o RET de ovinos. A suplementação  
41 com glicerina bruta de baixa pureza na concentração de 9% na dieta de bovinos  
42 promoveu uma melhora no número de células da linhagem germinativa, sem  
43 impacto no rendimento intrínseco da espermatogênese, mas com aumento na  
44 produção espermática diária por grama de testículo.

45  
46   **Palavras chave:** Bovinos; glicerina de baixa pureza; ovinos; farelo de cacau

1 **SPERMATOGENESIS IN RUMINANTS RECEIVING SUPPLEMENTATION**  
2 **WITH ALTERNATIVE SOURCES**  
3  
4

5 **ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the effects of partial  
6 inclusion of alternative energetic sources, cacao bran and low purity glycerin, in  
7 the diet about the spermatogenesis process of sheep and bovine, respectively.  
8 For that, twenty five sheep were divided into four treatments (0, 10, 20, 30% of  
9 cacao bran in the concentrate) and supplemented for 150 days and 24 bovine  
10 were divided into five treatments (0, 3, 6, 9, 12% of crude glycerin in the diet) and  
11 supplemented for 88 days. After the supplementation period the animals were  
12 sent to slaughter in specialized refrigerators and had their testicles collected for  
13 measuring and preparation of histological slides, for determinations of testicular  
14 morphometry parameters: quantification of seminiferous epithelium cell types,  
15 intrinsic spermatogenesis yield, index of Sertoli cells, total number of Sertoli cells  
16 (NTCS), NTCS per testicular gram, daily sperm production (PED), PED per  
17 testicular gram, testicular sperm reserve (RET) and RET per testicular gram. The  
18 data were submitted to analysis of normalcy by the Shapiro-Wilk test. The  
19 variables that met the assumptions of normality, were submitted to Analysis of  
20 Variance, Regression Test and the Dunnett Test. Those that did not meet the  
21 assumptions, were submitted to the Kruskal-Wallis Test. A level of 5% of  
22 significance was set for every analysis. The partial addition of cacao bran in the  
23 concentrate of sheep did not alter the germ cell epithelium cell population, except  
24 the number of type A spermatogonia cells that was lower in the control group  
25 compared to the group that received 20% of cacao bran in the concentrate. There  
26 was also a difference in the relation between type A spermatogonia cells and  
27 primary spermatocyte in leptotene (A/PL) and between Sertoli cells and primary  
28 spermatocyte in leptotene (S/PL), with the control higher when compared to the  
29 group that received 10% of bran, but not in relation to other levels evaluated.  
30 There was negative quadratic behavior for the NTCS, testicular NTCS/g, PED  
31 and RET variables. The addition of 12% of low purity glycerin in the bovine diet  
32 increased the number of primary spermatocytes in pre-leptotene and rounded  
33 spermatids ( $P < 0.05$ ). There was no effect of glycerin in the diet for the intrinsic  
34 spermatogenesis yield and index of Sertoli cells ( $P > 0.05$ ). Only daily sperm  
35 production per testicular gram suffered the effect of glycerin supplementation  
36 ( $P < 0.05$ ). The supplementation with cocoa bran at the level of 12,27% in the  
37 concentrate was been improved the NTCS, and 12,45% was improved the PED  
38 and RET of the sheeps. The supplementation with brute glycerine of low purity  
39 ate the level of 9% at the bovine's alimentation was be improved in the  
40 germinatives cells, without impact at the spermatogenesis intrinsic rendement  
41 yield, but was be increased the dairy sperm production.  
42

43 **Key words:** Bovine; Glycerin; Sheep; Cocoa bran  
44

## LISTA DE ABREVIATURAS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

|        |   |
|--------|---|
| µg     | Microgramas                                       |
| A      | Espermatogônias do tipo A                         |
| AEG    | Altura do epitélio germinativo                    |
| Ar     | Espermátide arredondada                           |
| CE     | Circunferência escrotal                           |
| CES    | Ciclo do epitélio seminífero                      |
| CTT    | Comprimento tubular total                         |
| CTTS   | Comprimento total dos túbulos seminíferos         |
| DIC    | Delineamento inteiramente casualizado             |
| DNM    | Diâmetro nuclear médio                            |
| DTS    | Diâmetro de túbulo seminífero                     |
| ECC    | Escore da condição corporal                       |
| mg     | Miligrama   |
| mL     | Mililitros  |
| mm     | Milímetros  |
| NTCS   | Número total de células de Sertoli                |
| NTCS/g | Número total de células de Sertoli por grama      |
| PED    | Produção espermática diária                       |
| PED/g  | Produção espermática diária por grama             |
| PL     | Espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno |
| PQ     | Espermatócitos primários em paquíteno             |
| r      | Raio  |
| RET    | Reserva espermática total                         |
| S      | Células de Sertoli                                |
| T      | Tratamentos                                       |
| TS     | Túbulo seminífero                                 |
| VTS    | Volume total dos túbulos seminíferos              |



## LISTA DE TABELAS

1

2

3

### 4 Capítulo 1

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Percentual dos ingredientes nos concentrados experimentais.....  | 17 |
| Tabela 2 | População celular do epitélio seminífero de ovinos suplementados com farelo de cacau no concentrado.....   | 20 |
| Tabela 3 | Rendimento intrínseco da espermatogênese de ovinos suplementados com farelo de cacau no concentrado.....   | 21 |
| Tabela 4 | Índices de células de Sertoli de ovinos suplementados com farelo de cacau no concentrado.....  | 22 |
| Tabela 5 | Estimativas da produção espermática e de células de Sertoli total e por grama de testículo, calculado a partir da análise da histologia testicular de ovinos suplementados com farelo de cacau no concentrado..... | 23 |

5

### 6 Capítulo 2

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Percentual dos ingredientes nos concentrados experimentais.....   | 31 |
| Tabela 2 | População celular do epitélio seminífero de bovinos suplementados com glicerina bruta de baixa pureza no concentrado.....   | 34 |
| Tabela 3 | Rendimento intrínseco da espermatogênese de bovinos suplementados com glicerina bruta de baixa pureza no concentrado.....   | 35 |
| Tabela 4 | Índices de células de Sertoli de bovinos suplementados com glicerina bruta de baixa pureza no concentrado.....  | 36 |
| Tabela 5 | Estimativas da produção espermática e de células de Sertoli total e por grama de testículo de bovinos suplementados com glicerina bruta de baixa pureza no concentrado..... | 36 |

7

8

## SUMÁRIO

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | INTRODUÇÃO GERAL.....   | 1  |
| 2  | REVISÃO DE LITERATURA.....  | 3  |
|    | 2.1 Aspectos relacionados à espermatogênese de ovinos.....  | 3  |
|    | 2.2 Farelo de cacau na dieta e seus possíveis efeitos sobre a<br>reprodução de machos.....  | 6  |
|    | 2.3 Aspectos relacionados à espermatogênese de bovinos.....   | 9  |
|    | 2.4 Glicerina bruta de baixa pureza e seus efeitos na reprodução<br>de machos.....  | 10 |
| 3  | CAPÍTULO 1 - ESPERMATOGÊNESE EM OVINOS<br>SUPLEMENTADOS COM INCLUSÃO PARCIAL DE FARELO DE<br>CACAU EM SUBSTITUIÇÃO AOS FARELOS DE MILHO E SOJA DO<br>CONCENTRADO..... | 13 |
|    | 3.1 INTRODUÇÃO.....   | 15 |
|    | 3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 16 |
|    | 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 20 |
|    | 3.4 CONCLUSÃO.....  | 24 |
|    | 3.5 REFERÊNCIAS.....  | 24 |
| 4. | CAPÍTULO 2 - ESPERMATOGÊNESE EM BOVINOS<br>SUPLEMENTADOS COM INCLUSÃO PARCIAL DE GLICERINA DE<br>BAIXA PUREZA NA DIETA.....   | 27 |
|    | 4.1 INTRODUÇÃO.....   | 29 |
|    | 4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 30 |
|    | 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 33 |
|    | 4.4 CONCLUSÃO.....  | 37 |
|    | 4.5 REFERÊNCIAS.....  | 37 |
| 5  | CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 40 |
| 6  | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 41 |
|    | ANEXOS.....   | 45 |

4

5

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os ruminantes compõem um dos principais grupos de animais domésticos destinados à produção de carne para alimentação humana, sendo produzido anualmente, valores em torno de 14 milhões de toneladas de carne ovina (FAO, 2015) e 70 milhões de toneladas de carne bovina (CICARNE, 2020). Apesar dos resultados bastante satisfatórios obtidos com dietas a base de ingredientes tradicionais, como é o caso do milho e da soja, a busca por alimentos alternativos é habitual, fundamentada principalmente na redução dos custos produtivos, mantendo resultados similares aos obtidos com dietas convencionais (STRADA et al., 2019).

Uma alimentação balanceada, atendendo as exigências nutricionais de cada espécie, é fundamental para explorar seu total potencial reprodutivo (SOUZA et al., 2019). No caso dos machos, esse fator é ainda mais preponderante, pois, em sistemas econômicos de produção, a relação macho:fêmea é alta, de forma que um único reprodutor é necessário para cobrir um elevado número de fêmeas, demandando assim uma elevada concentração de energia para desempenhar tal função.

Os suplementos energético-proteicos, além de subsidiar a demanda de manutenção metabólica do organismo, fornece energia para processos biológicos secundários, tais como, os reprodutivos (LUCY et al., 1992; DENG et al., 2013). Relatos comprovam que a energia metabolizável dos alimentos concentrados eleva as taxas de espermatogênese dos ruminantes, desde que sejam oferecidas em quantidades ideais (DENG et al., 2013; GABRIELSEN e TANRIKUT, 2016).

Diversos ingredientes provenientes da agroindústria, considerados como resíduos, apresentam potencial bromatológico para substituição total ou parcial dos alimentos convencionais, mantendo o padrão, e em alguns casos, até melhorando as taxas de espermatogênese e aspectos referentes à morfometria testicular (ROCHA et al., 2020; SOUZA et al., 2019). Sendo a escolha do ingrediente fundamentada basicamente pela relação custo benefício.

A utilização de resíduos na alimentação animal é uma grande revolução no setor agroindustrial, pois, além de representar redução nos custos de

1 produção, alguns desses insumos, tais como, os resíduos das cervejarias e a  
2 glicerina, obtida a partir do processo de produção do biodiesel, outrora, eram  
3 descartados, impactando negativamente o meio ambiente e as relações  
4 ecológicas existentes (VERDE et al., 2019).

5 A escolha do item alimentar alternativo, sobretudo, objetiva reduzir os  
6 custos gerados na alimentação dos animais, que é responsável pelo maior  
7 montante empregado na produção animal, além de manter um bom desempenho  
8 produtivo (MARQUES et al., 2002). Contudo, deve se levar em consideração os  
9 efeitos gerados sobre os aspectos reprodutivos dos animais, pois muitos dessas  
10 fontes alternativas podem reduzir o desempenho dos animais, representando  
11 prejuízos financeiros (CRISOSTOMO et al., 2017).

12 Assim sendo, fica evidenciado a necessidade de buscar fontes  
13 alternativas passíveis de inclusão na alimentação desses animais, expandindo o  
14 leque de oportunidades e tornando a produção mais rentável e acessível. Dessa  
15 forma, o objetivo com o estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com farelo  
16 de cacau e glicerina bruta de baixa pureza, sobre o processo espermatogênico  
17 em ovinos e bovinos, respectivamente.

18

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos relacionados à espermatogênese em ovinos

A espermatogênese é o processo de formação dos espermatozoides e ocorre nos túbulos seminíferos nos testículos. Nos ovinos tem duração média de 42,3 dias e o ciclo do epitélio seminíferos, que é o evento de multiplicação e diferenciação das células germinativas, tem duração de 10,5 dias (RIVIERS et al., 1987). A microarquitetura do parênquima testicular exerce uma função direta sobre o processo espermatogênico, de forma que a relação existente entre a razão dos tipos celulares, que é influenciada diretamente pela dieta do animal, é capaz de regular todo o processo (YANG et al., 2020).

A espermatogênese em ovinos é dividida em três etapas de acordo com alterações morfofuncionais das células envolvidas (AMANN e SCHANBACHER, 1983). A fase proliferativa é a primeira do processo espermatogênico e é classificada pela multiplicação via mitose das células espermatogônias do tipo A. Originar novas células é importante para que parte possa se diferenciar em espermatogônias tipo B dando continuidade ao processo, e outra parte seja mantida para multiplicações futuras. Ao final dessa etapa, células do tipo B sofrem mitose e originam espermatócitos primários em pré-leptóteno (JONHSON et al., 2000).

Na etapa meiótica, que é a segunda do processo, os espermatócitos primários irão sofrer uma primeira meiose reducional gerando os espermatócitos secundários, que em seguida, sofrem nova meiose, dando origem às espermátides arredondadas (AMANN e SCHANBACHER, 1983).

Na terceira fase, denominada espermiogênese, cada espermátide arredondada sofrerá alterações morfológicas, sendo diferenciadas em espermátides alongadas. Posteriormente, ocorrerá o desenvolvimento do flagelo e acrossoma, tornando um espermatozoide funcional que poderá ser liberado no lúmen do túbulo seminífero, por meio da espermiação (JOHNSON et al., 2000).

Segundo Martins et al. (2008), o peso testicular e a circunferência escrotal de carneiros exercem influência direta sobre os aspectos espermatogênicos do

1 animal, existindo uma relação de proporcionalidade entre volume e comprimento  
2 dos túbulos seminíferos; número de células de Sertoli, espermatogônias tipo A,  
3 espermatócitos em paquíteno, espermatídes arredondadas por secção de túbulo  
4 seminífero e por testículo; número de espermatídes por célula de Sertoli e por  
5 espermatogônia tipo A.

6 De acordo com Boujrad et al. (1995), o número de células de Sertoli e  
7 espermatogônias controlam a produção diária de espermatozoide. As células de  
8 Sertoli iniciam seu desenvolvimento ainda na fase fetal e aumentam em  
9 quantidade cerca de cinco vezes até a puberdade (REVIERS et al., 1987). Esse  
10 número pode ser afetado na fase embrionária em função da composição e  
11 quantidade de alimento ofertado à mãe durante a gestação, comprometendo  
12 também a contagem total do tipo celular durante a idade adulta do animal,  
13 reduzindo, conseqüentemente, a produção de espermatozoides (CIGANKOVA,  
14 1983).

15 Estudo realizado por Sousa et al. (2014) descreve parâmetros  
16 morfométricos testiculares de ovinos machos, da raça Morada Nova, de 42  
17 semanas de idade. Segundo os autores, a população média de células de Sertoli  
18 por testículo foi de  $1,9 \pm 0,1 \times 10^9$  e para cada Sertoli existiam  $0,1 \pm 0,01$   
19 espermatogônias tipo A;  $3,0 \pm 0,2$  espermatócitos em paquíteno e  $7,7 \pm 0,5$   
20 espermatídes arredondadas. A produção diária de espermatozoides foi de  
21  $5,6 \times 10^6$  por grama de parênquima testicular.

22 Já Rocha et al. (2020) utilizaram ovinos mestiços da raça Santa Inês, de  
23 aproximadamente nove meses de idade, e encontraram os seguintes valores  
24 corrigidos para população celular do parênquima testicular dos animais,  
25  $6,76 \pm 0,84$  para células de Sertoli,  $0,81 \pm 0,09$  para espermatogônias tipo A,  
26  $13,63 \pm 4,09$  para espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno,  
27  $15,16 \pm 5,35$  para espermatócitos primários em paquíteno e  $53,47 \pm 16,03$  para  
28 espermatídes arredondadas.

29 Segundo Leal et al. (2004), em caprinos, o número de espermatídes  
30 arredondadas por espermatócito primário em paquíteno foi de 2,8; evidenciando  
31 30% de perda por degeneração natural, e cada célula de Sertoli foi responsável  
32 por suportar 24 espermatídes arredondadas, havendo uma produção média  
33 diária de 30 milhões de espermatozoides por grama de parênquima testicular.  
34 Apesar de ser uma espécie diferente, a similaridade fisiológica entre caprinos e

1 ovinos sugere que esses valores representam bem os possíveis achados na  
2 espécie ovina, apesar da diferença com os resultados de Sousa et al. (2014),  
3 que possivelmente são justificadas pela diferença de idade e peso dos animais.

4 Para Guan et al. (2016), dietas contendo valores nutricionais com cerca  
5 de 10% a menos de proteína e energia necessária para manutenção metabólica  
6 de carneiros sexualmente maduros durante 65 dias, afeta negativamente o  
7 processo de espermatogênese dos animais. Apesar de não reduzir a população  
8 total de células de Sertoli, a privação de alimento diminuiu significativamente  
9 suas funções no processo de produção espermática quando comparado ao  
10 tratamento com valor nutricional de 10% acima do necessário para manutenção  
11 corporal.

12 Segundo Rodrigues et al. (2016), além do fator nutricional, a bipartição  
13 nos testículos dos ovinos é um fator que influencia nos aspectos  
14 espermatogênicos dos animais. No seu estudo, os autores verificaram que  
15 carneiros que apresentavam uma bipartição testicular, na região da cauda do  
16 epidídimo, possuíam maior eficiência meiótica ( $27,20 \pm 6,08$ ) do que animais que  
17 não apresentavam essa bipartição, cuja eficiência foi de  $19,37 \pm 2,86$ .

18 Assim como as células de Sertoli, as espermatogônias, que são  
19 subdivididas em oito estágios, sendo três iniciais, três intermediários e dois finais,  
20 são células muito susceptíveis a degenerações. Segundo Bilaspure e Guraya  
21 (1986), as espermatogônias naturalmente sofrem degenerações, principalmente  
22 nas fases intermediárias e final do desenvolvimento celular, reduzindo a  
23 produção estimada de espermatozoides por espermatogônia de 64 para um  
24 valor correspondente a 47,58% desse total. Esse resultado ainda sugere que  
25 degenerações induzidas por compostos alimentares podem reduzir ainda mais  
26 essa produção espermática.

27 De acordo com Olejnik et al. (2018), as espermatogônias têm um alto  
28 potencial de proliferação, restabelecendo-se numericamente em período  
29 próximo a três semanas na espécie ovina. Contudo, os danos causados, mesmo  
30 nesse intervalo inferior a um mês, podem significar perda econômica em função  
31 da indisponibilidade funcional do testículo e a sazonalidade existente entre  
32 estações de cobertura em sistemas comerciais de produção de ovinos

33 Além das diferentes concentrações de alimento fornecida ao reprodutor,  
34 variados componentes alimentares concentrados, utilizados na substituição do

1 milho e farelo de soja, também costumam exercer diferentes efeitos sobre a  
2 espermatogênese de ovinos. A utilização de insumos alternativos busca reduzir  
3 custos na produção, contudo, é extremamente fundamental conhecer os efeitos  
4 desses ingredientes sobre os aspectos reprodutivos dos animais (NUNES et al.,  
5 1978).

6

## 7 **2.2 Farelo de cacau na dieta e seus efeitos sobre a reprodução de machos**

8

9 O farelo de cacau é um alimento energético-proteico (ADAMAFIO, 2013),  
10 e apresenta-se como uma excelente alternativa em substituição parcial ao milho  
11 e à soja nas dietas concentradas de ovinos. Além disso, sua grande abundância  
12 em regiões de clima tropical quente, como no nordeste brasileiro, e grande parte  
13 do continente africano, contribuem para maior utilização do insumo como  
14 alternativa regional (NOGUEIRA, 2013).

15 De forma geral, a literatura sugere que a inclusão do ingrediente na  
16 alimentação de ovinos seja regulada basicamente pela aceitabilidade dos  
17 animais. Segundo Tarka et al. (1981), a inclusão de até 9% de farelo de cacau  
18 não altera o consumo ou ganho de peso diário dos animais. Para Carvalho et al.  
19 (2006) e Pires et al. (2004) a inclusão pode chegar a 30% sem que haja redução  
20 no consumo de matéria seca ou mesmo no ganho de peso dos animais. Já para  
21 Carvalho et al. (2008) dietas acima de 15% de inclusão do farelo de cacau  
22 restringem seu consumo.

23 Comumente, o percentual de inclusão de farelo de cacau em substituição  
24 ao milho e soja é fundamentado exclusivamente no ganho de peso dos animais,  
25 valor ou disponibilidade do insumo. De certa forma, tratando-se de ovinos  
26 destinados ao corte, o ajuste da concentração do farelo de cacau na alimentação  
27 pode ser regulado pela relação do custo benefício do insumo sem maiores  
28 problemas, uma vez que esses animais são abatidos precocemente e não são  
29 utilizados para reprodução (ADAMAFIO, 2013).

30 Entretanto, da perspectiva reprodutiva, deve-se levar em consideração  
31 que o farelo de cacau é uma importante fonte de alcaloides, sendo a teobromina  
32 e cafeína as substâncias mais importantes do ponto de vista toxicológico  
33 (NUNES, 1978). Elevadas concentrações dessas substâncias podem  
34 representar impactos negativos nos processos reprodutivos, sobretudo entre



1 machos, cujo as degenerações no parênquima testicular podem ser irreversíveis  
2 (ETENG et al., 1997; POLLARD et al., 2001).

3 A teobromina é uma xantila metilada que pode ser encontrada na  
4 proporção entre 2,0 e 2,3% do peso total das sementes do cacau, que é a matéria  
5 prima utilizada para produção do farelo de cacau (ADAMAFIO, 2013). Estudos  
6 realizados por Wang et al. (1992) evidenciam que a 7-metilxantina, que é uma  
7 das moléculas geradas no metabolismo da teobromina, é responsável por  
8 aumentar significativamente a proporção de espermatozoides anormais, além de  
9 reduzir o peso testicular de camundongos machos.

10 Wang e Waller (1994) ainda complementam demonstrando que o  
11 consumo de altas concentrações da teobromina pode afetar também a  
12 concentração espermática de camundongos. Ainda segundo os autores, as  
13 células de Sertoli são os principais componentes testiculares afetados pela  
14 intoxicação, podendo causar degenerações severas aos testículos.

15 Segundo Funabashi et al. (2000), concentrações de 500mg/kg de  
16 teobromina consumidas diariamente durante duas semanas podem causar  
17 degenerações e necroses testiculares em ratos, além de induzir a descamação  
18 do epitélio seminífero e aparecimento de células gigantes multinucleadas no  
19 parênquima testicular. Além disso, os autores ainda complementam que doses  
20 mais baixas (250mg/kg) consumidas por quatro semanas podem apresentar os  
21 mesmos danos.

22 Objetivando avaliar a reversibilidade dos danos gerados pelo consumo  
23 inadequado de teobromina Tarka et al. (1981) submeteram camundongos a  
24 dietas incluindo 0; 0,2; 0,6 e 0,8% da substância em sua composição durante 49  
25 dias e realizaram uma orquiectomia unilateral para avaliar os danos. Foi  
26 evidenciado que os grupos de 0,6 e 0,8% apresentaram redução significativa no  
27 peso dos testículos. Ao suspender a teobromina por período igual ao da oferta,  
28 foi verificado que os danos gerados não foram reversíveis.

29 Não muito diferente da teobromina, a cafeína também é uma xantila  
30 metilada encontrada na proporção média de 0,1% em grãos de cacau (NUNES  
31 et al., 1978). Seu consumo em doses elevadas também é tóxico ao testículo e  
32 gera efeitos degenerativos similares à teobromina.

33 De acordo com Cavalcante et al. (2014), fêmeas de camundongo que  
34 receberam 20mg de cafeína diariamente, durante 13 semanas, induziram ações

1 deletérias irreversíveis no desenvolvimento testicular dos fetos, comprometendo  
2 o órgão em relação ao seu peso relativo, altura do epitélio seminífero, diâmetro  
3 e lúmen tubular, além da redução na produção de testosterona da prole, mesmo  
4 na fase adulta.

5 De forma semelhante, Park et al. (2016) verificaram que a cafeína  
6 promove os mesmos efeitos deletérios sobre o testículo de camundongos  
7 quando oferecida durante a fase pré-púbere. Segundo os autores, a cafeína  
8 insensibiliza as células de Leydig para as gonadotrofinas provocando a redução  
9 da produção da testosterona e todas as degenerações relacionadas à falta do  
10 hormônio.

11 Cientes dos efeitos negativos da cafeína sobre o desenvolvimento  
12 testicular de camundongos, Bae et al. (2017) decidiram avaliar os efeitos em  
13 relação à concentração e tempo de exposição da cafeína sobre o  
14 desenvolvimento testicular de camundongos pré-púberes. Os autores  
15 verificaram que o peso dos testículos dos animais diminuiu em função da dose  
16 de cafeína consumida, sendo a menor 20 e a maior 120mg/dia, a síntese de  
17 testosterona e a proliferação das células germinativas também foram reduzidas  
18 proporcionalmente. As mesmas alterações histológicas foram encontradas após  
19 40 dias de tratamento com a cafeína na concentração de 20mg/dia.

20 Wyker et al. (1977) apontam que a presença de cafeína, acrescida de  
21 forma exógena e em baixas concentrações promoveram aumento significativo  
22 da motilidade espermática de camundongos. Já Aprioku et al. (2020)  
23 demonstram que o consumo de cafeína, mesmo em baixas concentrações, não  
24 altera as características físico-químicas do sêmen, sugerindo que o consumo da  
25 cafeína não representa qualquer tipo de benefícios relacionados aos processos  
26 reprodutivos.

27 Apesar da toxicidade dos alcaloides existentes no farelo de cacau, relatos  
28 sugerem existir uma concentração mínima tolerada pelo organismo sem que  
29 haja a indução de efeitos testiculares deletérios, porém, essa concentração  
30 ainda é desconhecida na espécie ovina (TARKA et al., 1981; FUNABASHI et al.,  
31 2000). Em relação à espécie ovina, as concentrações passíveis de inclusão sem  
32 comprometer a espermatogênese do animal ainda são desconhecidas. Desse  
33 modo, é fundamental estudar os reais efeitos sobre a reprodução e definir  
34 concentrações viáveis a fim de validar o uso do ingrediente para reprodutores.

### 2.3 Aspectos relacionados à espermatogênese em bovinos

A espermatogênese em touros é descrita por Staub e Johnson (2018) como um processo finamente regulado de multiplicação celular nos túbulos seminíferos contidos nos testículos dos animais. Segundo os autores, o tempo médio de duração do ciclo do epitélio seminífero é de 13,5 dias, e a duração do período total da espermatogênese na espécie é de 61 dias, sendo 4,5 vezes maior do que o tempo de renovação do ciclo epitelial seminífero.

O processo espermatogênico em bovinos, assim como descrito para a espécie ovina, também é subdividido em três etapas que são caracterizadas de forma semelhante (AMANN e SCHANBACHER, 1983). A proliferação das células germinativas em touros é regulamentada pela contagem total de células de Sertoli e espermatogônias presentes e funcionais no parênquima testicular, bem como, na relação entre os tipos celulares (EKSTEDT et al., 1986).

De acordo com Nicolet et al. (1982), em situações de escassez de nutrientes, as células germinativas do epitélio seminífero morrem com cerca de 24 horas, contudo, as células de Sertoli, permanecem vivas por período superior a 72 horas. Uma vez reestabelecido o fornecimento de energia, as células de Sertoli estimulam o surgimento de uma nova onda do ciclo do epitélio seminífero a partir do aumento da secreção de lactato para suprir a demanda energética das células germinativas.

Berndtson et al. (1987) avaliaram a produção diária de espermatozoides de touros de 18 meses através da relação encontrada entre células de Sertoli e espermátides alongadas. Os autores verificaram que cada célula de Sertoli era responsável por sustentar 394 espermátides alongadas, a partir da produção e liberação de lactato, e em cada grama de parênquima testicular continham  $10,74 \times 10^9$  células de Sertoli.

Já Swierstra (1966), ao avaliar testículos de touros com 18 meses de idade, relataram que, para cada 2,04 células de Sertoli existia 0,62 espermatogônia no parênquima testicular. A produção espermática por grama de testículo nessas condições foi de  $16,9 \times 10^6$ /dia.

Johnson (1985) verificou que existe uma relação inversamente proporcional entre o número de espermatogônias presentes no parênquima

1 testicular e o grau de degenerações recorrentes no processo de  
2 espermatogêneses. De forma que, túbulos seminíferos com maiores números de  
3 espermatogônias apresentavam menores taxas de degenerações em  
4 espermatócitos primários, e conseqüentemente, maior número do tipo celular.

5 A produção diária de espermatozoides por grama de parênquima  
6 testicular é afetada por perdas degenerativas naturais (STAUB e JOHNSON,  
7 2018). Para Cupps e Laben (1960) algumas degenerações recorrentes no  
8 processo de espermatogênese podem ser justificadas pela ineficiência das  
9 células de Sertoli em manter o avanço dos ciclos do epitélio seminífero, pois,  
10 deficiências nutricionais podem comprometer a concentração espermática dos  
11 touros e reduzindo a fertilidade do rebanho.

12 Independente da presença numérica normal de células de Sertoli e  
13 espermatogônias, é comum surgirem degenerações nas camadas intermediárias  
14 da estratificação dos túbulos seminíferos, reduzindo significativamente a  
15 contagem de espermatócitos em leptóteno e em paquíteno, comprometendo os  
16 números da espermatogênese, sobretudo em animais mais velhos (JOHNSON,  
17 1986).

18

#### 19 **2.4 Glicerina bruta de baixa pureza e seus efeitos na reprodução de machos**

20

21 A glicerina bruta de baixa pureza é um resíduo da produção de biodiesel  
22 com elevado potencial para compor dietas concentradas de ruminantes  
23 (OLIVEIRA et al., 2013). De acordo com Schroder e Sudekun (1999), em sua  
24 composição está presente entre 63,3% de glicerol, 26,7% de metanol, 0,71% de  
25 estrato etéreo, 1,05% de fósforo, 2,20% de potássio, 0,11% de sódio, 0,0003%  
26 de proteína bruta. Contudo, esses valores podem variar em função do material  
27 vegetal utilizado e a forma de produção do biodiesel (YANG et al., 2012).

28 Após a ingestão, cerca de 44% do glicerol é fermentado pelos  
29 microorganismos ruminais e convertido em ácidos graxos voláteis, 43% é  
30 absorvido pelas papilas ruminais, e em caso de excesso de energia é  
31 direcionado ao fígado para formação do glicogênio, e 13% é excretado (LOOR e  
32 HERBIN, 2003; KREHBIEL, 2008).

33 A inclusão parcial da glicerina bruta de baixa pureza em substituição ao  
34 milho no suplemento concentrado fornecido para touros, pode manter os valores

1 encontrados para circunferência escrotal desses animais, assim como peso dos  
2 testículos (STRADA et al., 2020). Sabe-se que a circunferência escrotal tem alta  
3 correlação com as taxas de espermatogêneses em touros (DIAS et al., 2008).

4 De acordo com o estudo realizado por Santos et al. (2016), ao avaliarem  
5 os efeitos causados por concentrações de até 7,5% do volume de ração  
6 concentrada oferecida a ovinos em idade reprodutiva, não houve diferenças  
7 relacionadas à biometria testicular, assim como nas avaliações histológicas de  
8 altura do epitélio e diâmetro dos túbulos seminíferos.

9 Segundo Strada et al. (2020) a inclusão da glicerina em concentrações de  
10 até 12% na dieta concentrada de touros, além de não alterar a circunferência  
11 escrotal, também não afetou a concentração espermática nem a altura do epitélio  
12 ou diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais. Contudo, houve redução na  
13 contagem de células de Leydig apesar de não haver redução na concentração  
14 plasmática de testosterona, sugerindo, uma sobrecarga nas células de Leydig  
15 existente para manter as concentrações deste hormônio.

16 Para Cui e Guan (2016) alimentos com altas taxas de gordura dietética,  
17 assim como a glicerina em concentrações elevadas, é responsável por reduzir a  
18 proliferação de células de Leydig comprometendo a espermatogênese nesses  
19 animais pela baixa na concentração de testosterona. Além disso, Silva et al.  
20 (2015) descreveram, ainda, uma redução na altura do epitélio seminífero em  
21 ratos, em função da concentração de gordura ingerida.

22 De forma semelhante, Crisostomo et al. (2017) enfatizam os efeitos anti-  
23 espermatogênicos causados por hemorragias no parênquima testicular gerada  
24 por elevadas concentrações de glicerol, comprometendo a homeostase do  
25 órgão. Contudo, ainda segundo os autores, podem existir efeitos negativos de  
26 baixas de glicerol sobre as células testiculares.

27 De acordo com Wibbe e Bar (1984) o extravasamento do sangue nos  
28 túbulos seminíferos gerados por elevadas concentrações de glicerol promove  
29 uma parada transitória no processo espermatogênico. Essas informações foram  
30 baseadas em experimento de administração injetável de glicerol no testículo de  
31 camundongos, e segundo Eng et al. (1976) a exposição contínua a esse agente  
32 pode promover uma parada irreversível no processo de espermatogênese.

33 Segundo Cardoso et al. (2017) oferecer elevadas concentrações de  
34 glicerol pode gerar degenerações testiculares similares às causadas por

1 obesidade mórbida, causando efeitos deletérios agudos e comprometendo a  
2 espermatogênese dos animais independente da sua condição corporal. E em  
3 casos crônicos os efeitos continuam sendo os mesmos e possivelmente os  
4 animais estarão na condição de obesidade, propriamente dita, em virtude da  
5 dieta.

### 3 CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1

#### ESPERMATOGÊNESE EM OVINOS SUPLEMENTADOS COM FARELO DE CACAU NO CONCENTRADO

*Spermatogenesis in sheep supplemented with cocoa bran of the concentrate*

Artigo a ser submetido ao Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Qualis B1 na Área Zootecnia/Recursos Pesqueiros

**D. S. Macedo; L.P. Barbosa**

<sup>1</sup> Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB – Cruz das Almas, BA

**Resumo:** O objetivo com o estudo foi avaliar o efeito da inclusão do farelo de cacau no concentrado sobre o processo espermatogênico de ovinos. Vinte e cinco ovinos foram divididos em quatro tratamentos (0, 10, 20 e 30% de farelo de cacau no concentrado) e suplementados por 150 dias. Após o período, os animais foram abatidos e tiveram seus testículos coletados para preparação de lâminas histológicas e avaliações de morfometria testicular: quantificação dos tipos celulares do epitélio seminífero, rendimento intrínseco da espermatogênese, índices de células de Sertoli, número total de células de Sertoli (NTCS), NTCS por grama testicular, produção espermática diária (PED), PED por grama testicular, reserva espermática testicular (RET) e RET por grama testicular. Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido dos testes apropriados para cada condição, adotando-se o nível de 5% de significância. A utilização do farelo de cacau não alterou a população das células do epitélio germinativo ( $P>0,05$ ), exceto o número de espermatogônias tipo A que foi menor no grupo controle comparado ao grupo que recebeu 20%. Houve diferença na relação entre espermatogônias tipo A e espermatócitos primários em pré-leptóteno, e entre células de Sertoli e espermatócito primário em pré-leptóteno, com o controle maior em relação ao grupo que recebeu 10% do farelo, mas não em relação aos outros níveis avaliados. No nível de 30%, o ingrediente reduziu as variáveis NTCS, NTCS/g, PED e RET dos animais. Houve comportamento quadrático negativo para as variáveis NTCS, PED e RET. A suplementação com farelo de cacau até o nível de 12,27% no concentrado melhorou o NTCS e em até 12,45% o PED e o RET de ovinos.

**Palavras Chave:** Células de Sertoli, morfometria testicular, espermatogônias

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the effects of partial inclusion of cacao bran in the diet about the spermatogenesis process of sheep.

1 For that, twenty five sheep were divided into four treatments (0, 10, 20, 30% of  
2 cacao bran in the concentrate) and supplemented for 150 days. After the  
3 supplementation period the animals were sent to slaughter in specialized  
4 refrigerators and had their testicles collected for measuring and preparation of  
5 histological slides, for determinations of testicular morphometry parameters:  
6 quantification of seminiferous epithelium cell types, intrinsic spermatogenesis  
7 yield, index of Sertoli cells, total number of Sertoli cells (NTCS), NTCS per  
8 testicular gram, daily sperm production (PED), PED per testicular gram, testicular  
9 sperm reserve (RET) and RET per testicular gram. The data were submitted to  
10 analysis of normalcy by the Shapiro-Wilk test. The variables that met the  
11 assumptions of normality, were submitted to Analysis of Variance, Regression  
12 Test and the Dunnett Test. Those that did not meet the assumptions, were  
13 submitted to the Kruskal-Wallis Test. A level of 5% of significance was set for  
14 every analysis. The partial addition of cacao bran in the concentrate of sheep did  
15 not alter the germ cell epithelium cell population, except the number of type A  
16 spermatogonia cells that was lower in the control group compared to the group  
17 that received 20% of cacao bran in the concentrate. There was also a difference  
18 in the relation between type A spermatogonia cells and primary spermatocyte in  
19 leptotene and between Sertoli cells and primary spermatocyte in leptotene , with  
20 the control higher when compared to the group that received 10% of bran, but  
21 not in relation to other levels evaluated. There was negative quadratic behavior  
22 for the NTCS, testicular, PED and RET variables. The supplementation with  
23 cocoa bran up to the level of 12,27% was be improved the NTCS, and in the level  
24 of 12,45% was be improved The PED and RET of the sheeps.

25  
26 **Key words:** Sertoli cell, spermatogonia, testicular morphometry

27

28



### 3.1 INTRODUÇÃO

A alta produtividade de forragem em regiões de clima tropical é um fator preponderante para o pleno desenvolvimento da ovinocultura (Archimede et al., 2008). Todavia, para se obter índices reprodutivos mais elevados, é necessário adotar a suplementação com alimentos concentrados, sobretudo entre machos reprodutores (Deng et al., 2012). Apesar de elevar os custos de produção, o aumento das taxas de espermatogênese e outros aspectos reprodutivos, justificam os custos através do lucro final obtido com o melhoramento dos aspectos seminais e, conseqüentemente, aumento de nascimentos (Souza et al., 2019).

Utilizar fontes alternativas na alimentação concentrada de ovinos, pode significar aumento dos lucros obtidos, em função da disponibilidade do produto e redução do transporte (Junior et al., 2014; Silva et al., 2014). Entretanto, isoladamente, o fator economia não viabiliza a utilização de um determinado ingrediente alimentar, pois, além da atratividade financeira, é necessário que o insumo forneça os nutrientes necessários para que o animal possa expressar seu total potencial produtivo (Souza et al., 2019).

O farelo de cacau é um alimento de fácil acesso na Bahia e com elevado potencial para utilização na ovinocultura, proporcionando bons resultados relacionados à produtividade (Carvalho et al., 2006; Campos et al., 2017). Contudo, no critério reprodutivo, mais especificamente no processo espermatogênico, os efeitos das suplementações a base de farelo de cacau ainda são pouco conhecidos.

O grão do cacau, material utilizado para produção do farelo, é uma importante fonte de teobromina e cafeína, representando em média 2,2% e 0,1% respectivamente, do percentual total do insumo (Nunes, 1978; Adamafio, 2013). Sabe-se que essas substâncias, em concentrações elevadas, promovem efeitos negativos adversos sobre o parênquima testicular, e conseqüentemente, na espermatogênese, podendo reduzir o potencial reprodutivo dos animais (Funabashi et al., 2000; Park et al., 2016). Contudo, a cafeína em doses moderadas pode proporcionar benefícios à espermatogênese (Dias et al., 2015)

1 Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inclusão  
2 do farelo de cacau na alimentação concentrada oferecida à ovinos, sobre o  
3 processo espermatogênico.

### 4 5 **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

6  
7 O estudo foi conduzido no Setor de Ovinocultura da Universidade Federal  
8 do Recôncavo da Bahia, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia,  
9 posicionada na latitude 12°6'75"422" Sul e longitude 39°08'9"580" Oeste, com  
10 pluviosidade média de 1200mm e clima tropical quente tipo Af, segundo a  
11 classificação de Köppen. A temperatura máxima foi de 29,3°C e mínima de  
12 27,8°C durante o período experimental, com 150 dias de duração. O projeto foi  
13 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRB.

14 Foram utilizados 25 ovinos machos, não castrados, mestiços das raças  
15 Santa Inês x Dorper, com idade média inicial de 4 meses e peso médio inicial de  
16 25,09±4,19kg, com escore da condição corporal de 2,5±0,5, segundo a  
17 classificação proposta por Morand-Fehr e Hervieur (1999).

18 Os animais foram agrupados em quatro tratamentos (T) por delineamento  
19 inteiramente casualizado, diferenciados pelo percentual de inclusão do farelo de  
20 cacau no concentrado (Tab. 1), sendo T1 (n=6) grupo controle, sem inclusão de  
21 farelo de cacau, T2 (n=6), T3 (n=7) e T4 (n=6) com inclusão de 10, 20 e 30% de  
22 farelo de cacau, respectivamente.

23 Os animais foram mantidos em sistema semi-intensivo de produção, em  
24 área de pastejo rotacionado de capim Aruana (*Panicum maximum cv. Aruana*),  
25 com oferta de concentrado uma vez ao dia em comedouros privativos, e água *ad*  
26 *libitum*. O concentrado foi calculado para atender as exigências nutricionais da  
27 espécie (NRC, 2007), e a relação de consumo volumoso:concentrado foi de  
28 60:40.

29 Ao término do período experimental os animais foram abatidos em  
30 frigorífico com sistema de inspeção estadual e seus testículos foram removidos  
31 para análises. Três fragmentos testiculares de cada animal, com medidas de  
32 1,0x1,0x1,0cm, foram retirados e mantidos em formaldeído tamponado a 10%  
33 durante 24 horas, em seguida mantidos em álcool à 70% até o momento da  
34 utilização.

1 **Tabela 1.** Percentual dos ingredientes nos concentrados experimentais

| Ingredientes           | Tratamentos (% de inclusão de farelo de cacau) |          |          |          |
|------------------------|--|----------|----------|----------|
|                        | T1 (0%)  | T2 (10%) | T3 (20%) | T4 (30%) |
| <b>Farelo de soja</b>  | 25,00  | 20,00    | 15,00    | 15,00    |
| <b>Farelo de cacau</b> | 0,0  | 13,30    | 26,50    | 39,70    |
| <b>Milho moído</b>     | 73,00  | 64,70    | 56,50    | 43,30    |
| <b>Núcleo mineral</b>  | 2,00   | 2,00     | 2,00     | 2,00     |
| <b>Composição</b>      |  |          |          |          |
| <b>MS</b>              | 88,13  | 87,76    | 87,40    | 87,07    |
| <b>PB (%)</b>          | 18,87  | 17,79    | 16,68    | 17,59    |
| <b>FDN (%)</b>         | 13,82  | 18,77    | 23,73    | 28,75    |
| <b>NDT (%)</b>         | 83,83  | 80,50    | 77,17    | 73,53    |

2 MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; NDT = nutrientes  
3 digestíveis totais.

4

5 Para a confecção das lâminas histológicas os fragmentos testiculares  
6 foram desidratados pela transição, a cada 30 minutos, em concentrações  
7 crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), concomitante à inclusão  
8 de glicol-metacrilato (Historesin, Leica, Suíça). Posteriormente, o material foi  
9 corado com azul de toluidina/borato de sódio 1%.

10 As variáveis avaliadas foram: população celular do epitélio seminífero;  
11 rendimento intrínseco da espermatogênese; índice de células de Sertoli; reserva  
12 espermática testicular total e por grama de testículo; produção espermática  
13 diária total e por grama de testículo. Todas foram obtidas a partir da avaliação  
14 de cinco seções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do  
15 epitélio seminífero (CES). As seções foram escolhidas ao acaso e a contagem  
16 foi baseada na presença de núcleos das células da linhagem espermatogênica  
17 e nucléolos das células de Sertoli.

18 A contagem obtida de cada tipo celular foi corrigida para o diâmetro  
19 nuclear médio (DNM) e a espessura do corte, utilizando a fórmula de  
20 Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962). Em relação a irregularidade  
21 morfológica dos núcleos de células de Sertoli, sua correção foi fundamentada no  
22 diâmetro médio dos nucléolos. As correções foram realizadas pela seguinte  
23 fórmula:

1

2

$$N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{Contagem total} \frac{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m})}{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m}) + \sqrt{\frac{(\text{DNM})^2}{2} - \frac{(\text{DNM})^2}{4}}}$$

3

4

5

6

7

Também foi realizada a correção para os valores de diâmetros dos túbulos e núcleos e nucléolos celulares. Todas as mensurações foram realizadas sob aumento de 400x, de forma que cada traço na régua micrométrica equivale a 2,5 $\mu\text{m}$ .

8

9

10

11

12

13

14

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais foi obtido pela divisão entre o número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e o número de espermatogônias do tipo A (A:PL). Para o rendimento meiótico utilizou-se a razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatócitos primários em paquíteno (PQ:Ar). O rendimento geral da espermatogênese foi definido pela razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatogônias do tipo A (A:Ar).

15

16

17

18

19

20

A ocorrência de perdas celulares durante a prófase meiótica foi determinada pela razão entre o número de espermatócitos primários em pré leptóteno/leptóteno e o número de espermatócitos primários em paquíteno (PL:PQ). Os índices de células de Sertoli foram determinados a partir da sua razão entre cada tipo de células germinativas, individualmente, e entre o somatório total das células germinativas por cada seção transversal.

21

22

23

24

25

26

27

Para calcular a população total de células de Sertoli foi utilizado o número corrigido de seus nucléolos por seção transversal de túbulos seminíferos. Foi realizada uma extrapolação para quantidade existente por grama de testículo, e consequentemente, para os testículos inteiros através do peso total dos órgãos, através do comprimento total de túbulos seminíferos, de acordo com a metodologia utilizada por Reviers e Lincoln (1978), através da seguinte fórmula:

28

$$NTCS = \frac{CTTS(m) \times N^{\circ} \text{ Corrigido de Celulas de Sertoli por seção Transversal}}{\text{Espessura histológica (m)}}$$

29

30

31

32

O NTCS é o número total de células de Sertoli; CTTS é comprimento total dos túbulos seminíferos. A determinação do número total de células de Sertoli por testículos foi realizada com a seguinte fórmula:

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

$$\text{NTCS/g} = \frac{\text{NTCS}}{\text{Peso do testículo}}$$

Para calcular a reserva espermática baseada na histologia quantitativa foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{RET} = \frac{\text{CTT (m)}}{\text{Espessura do corte (m)}} \times \text{média de Ar}$$

Sendo: RET a reserva espermática total; CTT o comprimento total dos túbulos; Ar as espermátides arredondadas por seção transversal. Posteriormente, foi realizada a extrapolação para o peso total dos testículos através da fórmula:

$$\text{RET/g} = \frac{\text{RET}}{\text{Peso do testículo}}$$

O cálculo da produção espermática diária (PED) foi fundamentado na histologia quantitativa dos testículos proposta por Amann e Almquist (1962).

Sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{volume total do túbulo seminífero} \times \text{N}^\circ \text{ médio corrigido de Ar no estágio 1 do CES}}{\text{Duração do CES(dias)} \times \text{Área de seção transversal do TS(m)} \times \text{Espessura do corte histológico (m)}}$$

Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que atenderam aos pressupostos da normalidade, foram submetidas a Análise de Variância, Teste de Regressão e Teste de Dunnet. Aquelas que não atenderam, foram submetidas ao Teste de Kruskal-Wallis. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as análises. Utilizou-se o *Software Statistical Package for the Social Sciences* [SPSS] (2015).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações celulares do epitélio seminífero permaneceram similares em relação à inclusão de farelo de cacau no suplemento concentrado, exceto para espermatogônias tipo A ( $P=0,048$ ). Para este parâmetro, o tratamento com 20% de farelo de cacau foi superior ao controle (Tab. 2).

Tabela 2. População celular do epitélio seminífero de ovinos suplementados com farelo de cacau no concentrado

| Variáveis             | Níveis de inclusão de farelo de cacau |              |              |              | P valor |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------|
|                       | 0%                                    | 10%          | 20%          | 30%          |         |
| <b>A<sup>1</sup></b>  | 1,82±0,35*                            | 2,24±0,29    | 2,39±0,31*   | 2,11±0,40    | 0,048   |
| <b>S<sup>1</sup></b>  | 4,70±0,72                             | 5,43±0,86    | 5,53±0,58    | 5,01±0,75    | 0,185   |
| <b>PL<sup>2</sup></b> | 30,94±5,61                            | 25,96±10,41  | 34,84±5,51   | 32,06±11,05  | 0,066   |
| <b>PQ<sup>1</sup></b> | 56,90±11,95                           | 53,54±10,94  | 65,39±6,60   | 58,89±10,76  | 0,220   |
| <b>Ar<sup>1</sup></b> | 139,35±20,94                          | 159,06±40,65 | 170,69±21,49 | 152,09±20,54 | 0,239   |

A = Espermatogônia tipo A, S = células de Sertoli, PL= Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, PQ = Espermatócitos primários em paquíteno, Ar = Espermátides arredondadas. <sup>1</sup> = Os dados apresentaram distribuição normal e estão discriminados por média  $\pm$  desvio padrão; <sup>2</sup> = Os dados não apresentaram distribuição normal e estão discriminados por mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \*Indica diferença entre os tratamentos pela ANOVA e teste de Dunnett a 5% de significância.

Segundo Dias et al. (2015), a cafeína, em determinadas concentrações, é responsável por estimular a produção de lactato pelas células de Sertoli, oferecendo maior suporte nutricional para as células germinativas, de forma que, essa substância pode apresentar efeitos positivos na reprodução. Sendo talvez uma possível justificativa para o aumento das espermatogônias no grupo tratado com 20% de farelo de cacau.

De acordo com Wrobel et al. (1995), as degenerações ocorridas nas espermatogônias tipo A podem não impactar na produção de espermatócitos primários, devido à grande variação no êxito das divisões celulares ocorridas entre as classes espermatogoniais e demais tipos celulares subsequentes, justificado os resultados dos demais tipos celulares, apesar da reduzida contagem de espermatogônias tipo A no tratamento controle.

1 Em relação ao rendimento intrínseco da espermatogênese de ovinos,  
 2 houve diferença na variável A:PL ( $P=0,01$ ), com superioridade do grupo controle  
 3 em relação ao tratamento de 10% do farelo de cacau (Tab. 3). Para as demais  
 4 variáveis não houve efeito dos tratamentos ( $P>0,05$ ).

5

6 Tabela 3. Rendimento intrínseco da espermatogênese de ovinos suplementados  
 7 com farelo de cacau no concentrado

| Variáveis    | Níveis de inclusão de farelo de cacau (Razão) |                 |                |                 | P valor |
|--------------|---|-----------------|----------------|-----------------|---------|
|              | 0%  | 10%             | 20%            | 30%             |         |
| <b>A:PL</b>  | 1 : 16,42±2,58*                               | 1 : 12,34±2,03* | 1 : 14,58±1,67 | 1 : 15,24±0,98  | 0,010   |
| <b>PL:PQ</b> | 1 : 1,99±0,64                                 | 1 : 1,94±0,09   | 1 : 1,89±0,11  | 1 : 1,84±0,12   | 0,870   |
| <b>PQ:Ar</b> | 1 : 2,54±0,66                                 | 1 : 2,96±0,25   | 1 : 2,61±0,21  | 1 : 2,63±0,44   | 0,350   |
| <b>A:Ar</b>  | 1 : 77,24±9,19                                | 1 : 71,31±16,53 | 1 : 71,89±8,80 | 1 : 74,02±15,37 | 0,846   |

8 A = Espermatogônia tipo A; PL= Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno; PQ =  
 9 Espermatócitos primários em paquíteno; Ar = Espermátides arredondadas. Os dados  
 10 apresentaram distribuição normal e correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão das razões entre  
 11 tipos celulares. \*Indica diferença entre os tratamentos pela ANOVA e teste de Dunnett a 5% de  
 12 significância.

13 Durante o processo espermatogênico as células germinativas são  
 14 sucessíveis a degenerações, ocorridas por causas naturais ou não, e os PL são  
 15 as células mais vulneráveis nessa situação (Andreussi et al., 2013). É provável  
 16 que a contagem reduzida de PL no tratamento de 10% de farelo de cacau esteja  
 17 relacionada a flutuações naturais decorrentes do processo espermatogênico,  
 18 pois, os tratamentos controle e com doses superiores do alimento não  
 19 demonstraram alterações.

20 Estudos sugerem uma variação, comum, no processo espermatogênico  
 21 de pequenos ruminantes (Leal et al., 2004; Sousa et al., 2014; Rocha et al.,  
 22 2019). Variações nesse sentido, podem ser justificadas por degenerações  
 23 ocorridas naturalmente gerando uma grande variação dentro da espécie e até  
 24 mesmo em diferentes túbulos seminíferos do mesmo animal, devido à dinâmica  
 25 de ondas (Perey et al., 1961)

26 O índice de células de Sertoli apresentou diferença para variável células  
 27 de Sertoli/espermatócito em pré-leptóteno/leptóteno ( $P=0,008$ ). A relação entre  
 28 células de Sertoli e demais tipos celulares do epitélio seminífero permaneceu  
 29 similar ( $P>0,05$ ) (Tab. 4).

30

1 Tabela 4. Índices de células de Sertoli de ovinos suplementados com farelo de  
2 cacau no concentrado

| Níveis de inclusão de farelo de cacau (Razão) |                |                |                |                |         |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| Variáveis                                     | 0%             | 10%            | 20%            | 30%            | P valor |
| <b>S:A</b>                                    | 1 : 0,39±0,02  | 1 : 0,41±0,04  | 1 : 0,43±0,02  | 1 : 0,42±0,06  | 0,249   |
| <b>S:PL</b>                                   | 1 : 6,32±0,81* | 1 : 5,06±0,43* | 1 : 6,26±0,36  | 1 : 6,45±1,03  | 0,008   |
| <b>S:PQ</b>                                   | 1 : 12,23±2,76 | 1 : 9,82±0,78  | 1 : 11,85±0,85 | 1 : 11,81±1,55 | 0,078   |
| <b>S:Ar</b>                                   | 1 : 29,83±3,49 | 1 : 29,14±4,60 | 1 : 30,89±2,90 | 1 : 30,70±4,10 | 0,834   |
| <b>S:CG</b>                                   | 1 : 48,77±4,33 | 1 : 44,43±5,61 | 1 : 49,43±3,67 | 1 : 49,38±4,94 | 0,213   |

3 S = Células de Sertoli; A = Espermatogônia tipo A; PL= Espermatócitos primários em pré-  
4 leptóteno/leptóteno; PQ = Espermatócitos primários em paquíteno; Ar = Espermátides  
5 arredondadas; CG = Contagem geral da somatória de todos os tipos celulares exceto células de  
6 Sertoli. Os dados apresentaram distribuição normal, e correspondem às médias ± desvio padrão  
7 das razões entre tipos celulares. \* Indica diferença entre os tratamentos pela ANOVA e teste de  
8 Dunnett a 5% de significância.

9

10 De acordo com Boujrad et al. (1995) as células de Sertoli alcançam sua  
11 estabilização numérica na puberdade e as alterações espermatogênicas  
12 associadas a esse tipo celular, geralmente, são decorrentes de disfunções  
13 metabólicas e não costumam estar relacionados à redução no número total de  
14 células, salvo em casos de degenerações do tecido gonadal.

15 O farelo de cacau, mesmo possuindo substâncias consideradas tóxicas,  
16 não provocou impactos no processo de multiplicação das células de Sertoli dos  
17 animais (Adamafio, 2013), pois, a oferta do alimento neste estudo ocorreu após  
18 a puberdade. Contudo, apesar de não impactar numericamente as células de  
19 Sertoli, o farelo de cacau, em concentração elevada, provocou alterações nas  
20 suas funções, comprometendo o processo espermatogênico.

21 A alteração ocorrida na relação S:PL do tratamento com 10% de farelo de  
22 cacau está associada à variável PL que se apresentou inferior para relações com  
23 outros tipos celulares, antecessores, do epitélio seminífero, assim como ocorrido  
24 e justificado na Tab. 2.

25 Houve comportamento quadrático negativo para as variáveis NTCS,  
26 NTCS/g, PED e RET, apresentando um nível máximo de inclusão de farelo de  
27 cacau no suplemento concentrado de 12,27%, 12,27%, 12,45% e 12,45%,  
28 respectivamente (P<0,05). As variáveis PED/g e RET/g foram semelhantes entre  
29 os tratamentos (P>0,05) (Tab. 5).



1

2 Tabela 5. Estimativas da produção espermática e de células de Sertoli total e por  
3 grama de testículo, calculado a partir da análise da histologia testicular de ovinos  
4 suplementados com farelo de cacau no concentrado

| Variáveis                    | Níveis de inclusão de farelo de cacau                    |               |               |               | P<br>valor           |
|------------------------------|--|---------------|---------------|---------------|----------------------|
|                              | 0%   | 10%           | 20%           | 30%           |                      |
| NTCS (x10 <sup>9</sup> )**   | 2,87±0,67  | 4,24±1,10     | 3,74±0,54     | 1,32±0,28*    | 0,000                |
| NTCS/g (x10 <sup>6</sup> )   | 26,58±3,27   | 28,79±5,76    | 27,25±3,35    | 22,44±6,13    | 0,030                |
| PED (x10 <sup>9</sup> )**    | 8,21±2,34*   | 11,71±3,28    | 11,03±1,99    | 3,86±0,97*    | 0,000                |
| PED/g (x10 <sup>6</sup> )    | 58,12±9,10   | 80,35±23,37   | 80,59±14,89   | 74,26±19,23   | 0,110                |
| RET (x10 <sup>9</sup> )**    | 86,26±24,59*   | 122,97±34,46  | 115,85±20,94  | 40,59±10,24*  | 0,000                |
| RET/g (x10 <sup>6</sup> )    | 610,29±95,55   | 843,77±245,45 | 846,25±156,44 | 779,81±201,99 | 0,110                |
| <b>Equações de regressão</b> |  |               |               |               | <b>R<sup>2</sup></b> |
| NTCS (x10 <sup>9</sup> )**   | Y= - 281323970X <sup>2</sup> + 7004245168X + 84962299219 |               |               |               | 0,738                |
| PED (x10 <sup>9</sup> )**    | Y= - 9468491X <sup>2</sup> + 232345451X + 2875810701     |               |               |               | 0,675                |
| RET (x10 <sup>9</sup> )**    | Y= - 26792759X <sup>2</sup> + 667070968X + 8091647544    |               |               |               | 0,675                |

5 NTCS = Número total de células de Sertoli, PED = Produção espermática diária, RET = Reserva  
6 espermática testicular. Os dados apresentaram distribuição normal, e correspondem às médias  
7 ± desvio padrão das razões entre tipos celulares. \*Indica diferença entre os tratamentos pela  
8 ANOVA e teste de Dunnett a 5% de significância. \*\*Efeito quadrático negativo obtido pelo teste  
9 de Regressão a 5% de significância.

10

11 O consumo elevado e contínuo de teobromina e cafeína, existente no  
12 farelo de cacau (2,2% e 0,1%, respectivamente) (Adamafio, 2013; Berdnston et  
13 al., 1967), representando a ingestão média diária de 105mg/kg de teobromina e  
14 4,8mg/kg/dia de cafeína, por animal, podem justificar a redução dos parâmetros  
15 que apresentaram diferença no tratamento de 30%.

16 De acordo com Wang e Waller (1994) a teobromina em concentrações  
17 elevadas é responsável por reduzir o peso do parênquima testicular, e apontam  
18 as células de Sertoli como os principais alvo da substância. Segundo Funabashi  
19 et al. (2000), o consumo de 250mg/kg por dia durante quatro semanas pode  
20 induzir necroses testiculares e a descamação do epitélio seminífero,  
21 comprometendo os resultados obtidos na espermatogênese. Aqui o consumo da  
22 teobromina foi de 105mg/kg por dia, porém o período de oferta ultrapassou as 4  
23 semanas, somando um total de 21,4 semanas.

24 Além da teobromina a concentração elevada de cafeína também é capaz  
25 de alterar os resultados referentes à espermatogênese a partir da alteração do  
26 perfil oxidativo das células de Sertoli, vulnerabilizando suas proteínas e

1 comprometendo seu desenvolvimento e existência, culminando na redução da  
2 disponibilidade de lactato para as espermatogônias, e conseqüentemente, todo  
3 o decorrer do processo espermatogênico (Dias et al., 2015).

4 Entretanto, em doses moderadas, a cafeína é responsável por estimular  
5 o metabolismo das células de Sertoli e promover maior aporte nutricional e  
6 hormonal para o processo de espermatogênese, justificando assim o  
7 comportamento quadrático negativo da função que descreve os aspectos  
8 relacionados ao processo espermatogênico (Dias et al., 2015), indicando haver  
9 uma concentração benéfica do alimento.

### 11 3.4 CONCLUSÃO

13 A suplementação com farelo de cacau até o nível de 12,27% no  
14 concentrado melhorou o NTCS e NTCS/g em até 12,45% o PED e o RET de  
15 ovinos.

### 17 3.5 REFERÊNCIAS

18 AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII.  
19 Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. **J. Dair. Sci.**,  
20 v. 45, p.774-781, 1962.

22 ARCHIMEDE, H.; PELLONDE, P.; DESPOIS, P., et al. Growth performances and  
23 carcass traits of Ovin Martinik lambs fed various ratios of tropical forage to  
24 concentrate under intensive conditions. **Small Rumin. Resch**, v. 75, p. 162-170,  
25 2008.

27 BERDSTON, W.E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. relationship of absolute  
28 numbers of sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef  
29 bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 64, p. 241-246, 1987.

31 BOUJRAD, N.; REVIERS, T.H.; CARREAU, S. Evidence for germ cell control of  
32 Sertoli cell function in the three models of germ cell depletion in adult rat. **Biol. of**  
33 **Reprod.**, v. 53, p. 1345-1352, 1995.

35 CAMPOS, F.S.; GOIS, G.C.; VICENTE, S.L.A. et al. Alternativa de forragem para  
36 caprinos e ovinos criados no semiárido. **Nutrit.**, v. 14, p. 5004-5013, 2017.

38 CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. et al. Desempenho e  
39 digestibilidade de ovinos alimentados com farelo de cacau (*Theobroma cacao*  
40 L.) em diferentes níveis de substituição. **Ciên. Ani, Bras.**, v. 7, p. 115-122, 2006.

1  
2 DENG, K.; DIAO, Q.; JIANG, C. et al. Energy Requirements for Maintenance and  
3 Growth of German Mutton Merino Crossbred Lambs. **J. of Int. Agri.**, v. 12, p.  
4 670-677, 2012.

5  
6 DIAS, T.; ALVES, M.G.; BERNARDINHO, R.L. et al. Dose-dependent effects of  
7 caffeine in human Sertoli cells metabolismo and oxidative profile: relevance for  
8 male reproduction. *Toxicology*, v. 328, p. 12-20, 2015.

9  
10 JUNIOR, R.G.; CAVALI, J.; PORTO, M.O. et al. Resíduos agroindustriais e  
11 alimentação de ruminantes. **Rev. Bras. Ciên. Amaz.**, v. 3, p. 93-104, 2014.

12  
13 LEAL, M.C., BECKER-SILVA, S.C., CHIARINI-GARCIA. et al. Sertoli cell  
14 efficiency and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). **Anim. Reprod.**, v.  
15 1, p. 122-128, 2004.

16  
17 MORAND-FEHR, P.; HERVIEU, J. Apprécier l'état corporel des chèvres: Intérêt  
18 et méthod. **Reussir La Chevre**, n.231, p.22-34, 1999.

19  
20 **NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NUTRIENT REQUIREMENTS OF**  
21 **SMALL RUMINANTS)**. Washigton, d.c.: National Academy Press, 362 p, 2007.

22  
23 PEREY, B.Y.; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. The wave of the seminiferous  
24 epithelium in the rat. **Amer J. of Anat.**, v. 108, p. 47-77, 1961.

25  
26 REVIERS, M.T.H.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology 45 of the  
27 testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **J. Repr. and Fert.**, v. 54, p. 209-213,  
28 1978.

29  
30 ROCHA, L.F.; RIBEIRO, M.O.; SANTANA, A.L.A. et al. Spermatogenesis in  
31 sheep supplemented with detoxified castor bean (*Ricinus communis* L.) as a  
32 replacement for soybean meal. **Rev. Bras. Sal. Prod. Anim.**, v. 21, p. 13-21,  
33 2020.

34  
35 SILVA, A.M.; OLIVEIRA, R.L.; RIBEIRO, O.L. et al. Valor nutricional de resíduos  
36 da agroindústria para alimentação de ruminantes. **Com. Scien.** v. 5, p. 370-379,  
37 2014.

38  
39 SILVA, D.F.M.; FARIA, F.J.C.; FURTADO, F.H.G. et al. Functional Morphology  
40 of the spermatogeneis in gir bulls. **Agri. Sci.** v. 11, p. 1-14, 2020.

41  
42 SOUSA, F.M.L.; LOBO, C.H.; MENEZES, E.S.B. et al. Parameters of the  
43 Reproductive Tract, Spermatogenesis, Daily Sperm Production and Major  
44 Seminal Plasma Proteins of Tropically Adapted Morada Nova Rams. **Reprod. in**  
45 **Domes. Anim.** v. 49, p. 409-419, 2014.

46  
47 SOUZA, R.S.; BARBOSA, L.P.; PINHEIRO, A.M. et al. Semen quality and  
48 metabolic profile of goats fed flaxseed in the diet. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.** v.  
49 71, p. 899-908, 2019.

50

- 1 WROBEL, K.H.; BICKEL, D.; KUJAT, R. et al. Configuration and distribution of
- 2 bovine spermatogonia. **Cell Tiss. Res.**, v. 279, p. 277-289, 1995.
- 3

## 4 CAPÍTULO 2 – ARTIGO 2

**ESPERMATOGÊNESE EM BOVINOS SUPLEMENTADOS COM INCLUSÃO DE GLICERINA DE BAIXA PUREZA NO CONCENTRADO**

*Spermatogenesis in bovine supplemented with inclusion of low purity glycerin in the concentrate*

Artigo a ser submetido ao Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Qualis B1 na Área Zootecnia/Recursos Pesqueiros

**D.S. Macedo<sup>1</sup>, L.P. Barbosa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB – Cruz das Almas, BA

**Resumo:** O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de glicerina bruta de baixa pureza na alimentação de touros sobre o processo de espermatogênese. Foram utilizados 2 machos não castrados, da raça nelore com aproximadamente 428,0±32,11kg e 22 meses de idade. Os touros foram distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos de acordo com o percentual de glicerina adicionada na dieta (0, 3, 6, 9, 12%). Após o abate, os testículos foram removidos e processados histologicamente sendo quantificado os tipos celulares, o rendimento intrínseco da espermatogênese, índices de células de Sertoli, número total de células de Sertoli (NTCS), NTCS por grama testicular, produção diária espermática (PED), PED por grama testicular, reserva espermática testicular (RET) e RET por grama testicular. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste de Dunnet e os não-paramétricos por Kruskal-Wallis, todos a 5% de significância. A população celular do epitélio seminífero foi diferente para as variáveis espermatócitos primários em pré-leptóteno e leptóteno, em paquíteno e para espermátides arredondadas no tratamento de 9% de glicerina bruta de baixa pureza (P<0,05). A suplementação com glicerina bruta de baixa pureza na concentração de 9% na dieta de bovinos promoveu uma melhora no número de células da linhagem germinativa, sem impacto no rendimento intrínseco da espermatogênese, mas com aumento na produção espermática diária.

**Palavras Chave:** Células de Sertoli, espermatogônias, espermatozoides.

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the effects of inclusion of low purity glycerin in the diet about the spermatogenesis process of bovine. For that, 29 bovine were divided into five treatments (0, 3, 6, 9, 12% of crude glycerin in the diet) and supplemented for 88 days. After the supplementation period the animals were sent to slaughter in specialized refrigerators and had their testicles collected for measuring and preparation of histological slides, for determinations

1 of testicular morphometry parameters: quantification of seminiferous epithelium  
2 cell types, intrinsic spermatogenesis yield, index of Sertoli cells, total number of  
3 Sertoli cells (NTCS), NTCS per testicular gram, daily sperm production (PED),  
4 PED per testicular gram, testicular sperm reserve (RET) and RET per testicular  
5 gram. The data were submitted to analysis of normalcy by the Shapiro-Wilk test.  
6 The variables that met the assumptions of normality, were submitted to Analysis  
7 of Variance, Regression Test and the Dunnett Test. Those that did not meet the  
8 assumptions, were submitted to the Kruskal-Wallis Test. A level of 5% of  
9 significance was set for every analysis. The addition of 12% of low purity glycerin  
10 in the bovine diet increased the number of primary spermatocytes in pre-  
11 leptotene and rounded spermatids ( $P < 0.05$ ). There was no effect of glycerin in  
12 the diet for the intrinsic spermatogenesis yield and index of Sertoli cells ( $P > 0.05$ ).  
13 Only daily sperm production per testicular gram suffered the effect of glycerin  
14 supplementation ( $P < 0.05$ ). Supplementation with low purity glycerin at 9%  
15 concentration in bovine diet promoted an improvement in the number of germline  
16 cells, with no impact in the intrinsic spermatogenesis yield, but with increase in  
17 the daily sperm production.

18  
19 **Key words:** Sertoli cell, spermatogonia, spermatozoa

20

21

## 4.1 INTRODUÇÃO

A suplementação alimentar é uma prática de manejo que impacta positivamente a bovinocultura de corte (Murphy et al., 2017; Rutkowaska et al., 2016). Em touros designados à reprodução, além do princípio de manutenção da estrutura muscular, as dietas concentradas buscam subsidiar e otimizar os processos reprodutivos para aumentar o número de descendentes desses animais (Rodrigues et al., 2017). A bioprospecção de novos ingredientes com potencial de utilização na alimentação de bovinos reprodutores é fundamentada basicamente na relação custo benefício do insumo.

A alimentação é a parcela de maior custo dentro de um sistema de produção de bovinos de corte, representando até 70% dos custos totais envolvidos (Marques et al., 2002). De tal maneira, utilizar insumos econômica e logisticamente mais acessíveis, e que mantenham, ou melhorem os aspectos reprodutivos do rebanho, é uma excelente alternativa para ampliar as margens de lucro em relação às dietas concentradas convencionais (Strada et al., 2020).

A glicerina bruta de baixa pureza é um ingrediente com elevado potencial de utilização em substituição parcial do milho na dieta concentrada de bovinos, pois, além de ser economicamente mais atrativa, o ingrediente garante resultados similares ao milho (Strada et al., 2015). Contudo, seus efeitos efetivos sobre o processo espermatogênico em touros de corte ainda é pouco conhecido, subsidiando assim a necessidade de promoção de mais estudos acerca do tema.

A glicerina bruta de baixa pureza é um resíduo gerado na produção do biodiesel e contém entre 50 e 70% de glicerol na sua composição (Schroder e Sudekun, 1999; Abdalla et al., 2008). O glicerol excedente, após a utilização para ações metabólicas de manutenção, é direcionado para síntese de gordura (Loor e Herbein, 2003), que em condições elevadas podem reduzir a produção e concentração da testosterona e promover hemorragias no parênquima testicular, impactando negativamente no processo de espermatogênese (Cui e Guan, 2016; Crisostomo et al., 2017).

De tal forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de glicerina bruta de baixa pureza na suplementação de bovinos de corte sobre os aspectos relacionados à espermatogênese.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Setor de Bovinocultura de Corte da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), situada no município de Cruz das Almas, Bahia, latitude 12°675'422" Sul e longitude 39°089'580" Oeste. O município apresenta clima tropical quente, tipo Af segundo a classificação de Köppen e pluviosidade média de 1200mm. O período experimental compreendeu 88 dias. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UESB sob o número de protocolo CEUA 17/2012.

Foram utilizados 29 bovinos, mestiços da raça Nelore, com peso médio inicial de  $428,0 \pm 32,11$ kg, não castrados, com aproximadamente 22 meses de idade, distribuídos em Delineamento Inteiramente Casualizado em 5 tratamentos (T), distintos entre si pelo percentual de glicerina de baixa pureza contida na matéria seca total da suplementação, sendo: T1 (n=6) grupo controle, sem inclusão da glicerina, T2 (n=5) 3% de glicerina, T3 (n=6) 6% de glicerina, T4 (n=6) 9% de glicerina e T5 (n=6) 12% de glicerina. As dietas foram oferecidas diariamente e formuladas para promover ganho médio diário de 1,2kg na espécie bovina (NCR, 2007) (Tab. 1). Os animais foram mantidos durante o período experimental em 7 hectares de *Brachiaria decumbens*, divididos em cinco piquetes.

Após o período experimental os animais foram encaminhados para o abate, que ocorreu em frigorífico com inspeção estadual, e os testículos dos animais foram removidos e foi retirado três fragmentos de 1,0x1,0x0,5cm de cada animal, que foi imerso em formaldeído tamponado a 10% por 24 horas. As lâminas foram confeccionadas segundo a metodologia proposta por Luna (1968).

Foram avaliadas cinco seções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES), para determinação da: população celular do epitélio seminífero; do rendimento intrínseco da espermatogênese; do índice de células de Sertoli; da reserva espermática testicular total e por grama de testículo; e da produção espermática diária total e por grama de testículo.



1 Tabela 1. Percentual dos ingredientes nos concentrados experimentais

| Ingredientes             | Tratamentos (% de inclusão de Glicerina) |         |         |         |          |
|--------------------------|--|---------|---------|---------|----------|
|                          | T1 (0%)                                  | T2 (3%) | T3 (6%) | T4 (9%) | T5 (12%) |
| <b>Farelo de soja</b>    | 17,30                                    | 18,95   | 20,64   | 22,35   | 24,10    |
| <b>Glicerina</b>         | -  | 6,76    | 13,65   | 20,68   | 27,85    |
| <b>Ureia</b>             | 1,85                                     | 1,87    | 1,88    | 1,90    | 1,92     |
| <b>Milho moído</b>       | 79,35                                    | 70,91   | 62,30   | 53,53   | 44,58    |
| <b>Núcleo mineral</b>    | 0,99                                     | 1,00    | 1,00    | 1,02    | 1,02     |
| <b>Calcário</b>          | 0,51                                     | 0,51    | 0,52    | 0,52    | 0,53     |
| Composição Bromatológica |  |         |         |         |          |
| <b>MS</b>                | 85,81                                    | 87,52   | 86,00   | 84,49   | 85,36    |
| <b>PB (%)</b>            | 24,39                                    | 24,69   | 24,29   | 22,33   | 23,54    |
| <b>FDN (%)</b>           | 25,49                                    | 25,01   | 25,25   | 18,98   | 18,51    |
| <b>NDT (%)</b>           | 89,00                                    | 85,84   | 84,87   | 92,13   | 92,66    |

2 MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; NDT = nutrientes  
3 digestíveis totais.

4

5 Na estimativa da população celular do epitélio seminífero as seções  
6 transversais foram selecionadas aleatoriamente, sendo contabilizado os núcleos  
7 de cada tipo celular da linhagem espermatogênica (espermatogônia tipo A;  
8 espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno, espermatócitos em paquíteno e  
9 espermátides arredondadas), assim como os nucléolos das células de Sertoli,  
10 permitindo gerar uma média estimada para presença de cada tipo celular.

11 A contagem de cada tipo celular foi corrigida para seu respectivo diâmetro  
12 nuclear médio e espessura do fragmento, segundo a Abercrombie (1946)  
13 modificada por Amann (1962). Por não apresentar núcleo circular regular, assim  
14 com as demais células do epitélio seminífero, o ajuste nas células de Sertoli foi  
15 feito para os nucléolos. Todas correções foram feitas por meio da fórmula:

16

$$17 \quad N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{Contagem total} \frac{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m})}{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m}) + \sqrt{\frac{(\text{DNM})^2}{2} - \frac{(\text{DNM})^2}{4}}}$$

18

19 O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais foi obtido a partir  
20 da relação entre espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PL) e

1 espermatogônias do tipo A (A) (A:PL). O rendimento meiótico foi obtido pela  
 2 razão entre espermatócitos em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas  
 3 (Ar) (PQ:Ar). Para o rendimento geral da espermatogênese a relação foi entre  
 4 espermatogônias tipo A e espermátides arredondadas (A:Ar). Para estimar as  
 5 perdas celulares durante a profase meiótica foi feita a relação entre o número de  
 6 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e em paquíteno (PL:PQ).  
 7 Os índices de células de Sertoli foram obtidos a partir da relação do número de  
 8 células de Sertoli com cada um dos tipos celulares da linhagem espermatogênica  
 9 individualmente, e do somatório de todos os tipos celulares.

10 A população total de células de Sertoli foi estimada a partir do número  
 11 corrigido de seus nucléolos por seção transversal de túbulos seminíferos. Foi  
 12 realizada uma estimativa para quantidade existente por grama de testículo, e por  
 13 testículo, através do comprimento total de túbulos seminíferos, de acordo com a  
 14 metodologia utilizada por Reviers e Lincoln (1978), a partir da seguinte fórmula:

$$15 \quad NTCS = \frac{CTTS(m) \times N^{\circ} \text{ Corrigido de Celulas de Sertoli por seção Transversal}}{\text{Espessura histológica (m)}}$$

16  
 17  
 18 O NTCS é o número total de células de Sertoli e o CTTS é comprimento  
 19 total dos túbulos seminíferos. A extrapolação do número total de células de  
 20 Sertoli por testículos foi realizada com a seguinte fórmula:

$$21 \quad \frac{NTCS}{\text{Peso médio testicular}}$$

22  
 23  
 24 Para calcular a reserva espermática baseada na histologia quantitativa foi  
 25 usada a seguinte fórmula:

$$26 \quad RET = \frac{CTT (m)}{\text{Espessura do corte (m)}} \times \text{média de Ar}$$

27  
 28  
 29 Sendo: RET a reserva espermática total; CTT o comprimento total dos  
 30 túbulos; Ar as espermátides arredondadas por seção transversal.  
 31 Posteriormente, foi realizada a estrapolação para a RET por grama de testículo  
 32 através da fórmula:

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

$$\frac{\text{RET}}{\text{Peso médio testicular}}$$

O cálculo da produção espermática diária (PED) foi fundamentado na histologia quantitativa dos testículos proposta por Amann e Almquist (1962). Sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{volume total do túbulo seminífero} \times \text{N}^{\circ} \text{ médio corrigido de Ar no estágio 1 do CES}}{\text{Duração do CES(dias)} \times \text{Área de seção transversal do TS(m)} \times \text{Espessura do corte histológico (m)}}$$

Posteriormente, foi realizada a estrapolação para a PED por grama de testículo através da fórmula:

$$\frac{\text{PED}}{\text{Peso médio testicular}}$$

Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que atenderam aos pressupostos da normalidade, foram submetidas a Análise de Variância e Teste de Dunnet. Aquelas que não atenderam, foram submetidas ao teste ajustado de Kruskal-Wallis. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as análises. Utilizou-se o *Software Statistical Package for the Social Sciences* [SPSS] (2015).

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população celular do epitélio seminífero de touros suplementados com glicerina bruta de baixa pureza apresentou diferença apenas no tratamento de 9% para as variáveis A, PL e PQ ( $P < 0,05$ ) (Tab. 2).

Quando ofertada de forma adequada, parte da energia contida na alimentação de touros é demandada para o processo de espermatogênese dos animais (Shi et al., 2017). Contudo, apesar de ser essencial para a formação dos gametas, a energia dietética, em concentrações inadequadas, é capaz de reduzir o potencial espermatogênico, além de causar lesões no parênquima testicular (Crisostomo et al., 2017).

1 Tabela 2. População celular do epitélio seminífero de bovinos suplementados  
 2 com glicerina bruta de baixa pureza no concentrado

| Variáveis       | Níveis de inclusão de glicerina de baixa pureza |              |              |               |             | P valor |
|-----------------|---|--------------|--------------|---------------|-------------|---------|
|                 | 0%  | 3%           | 6%           | 9%            | 12%         |         |
| A <sup>1</sup>  | 1,55±1,20                                       | 2,13±0,78    | 2,13±0,44    | 2,32±0,28     | 2,12±0,02   | 0,409   |
| S <sup>2</sup>  | 4,35±1,19                                       | 4,38±0,92    | 4,82±1,00    | 5,16±0,61     | 4,65±0,01   | 0,479   |
| PL <sup>2</sup> | 26,61±4,37*                                     | 26,21±1,58   | 27,07±5,51   | 32,20±3,61*   | 25,83±0,04  | 0,037   |
| PQ <sup>2</sup> | 53,29±8,82*                                     | 50,51±3,20   | 53,76±8,03   | 61,77±7,57*   | 50,54±0,11  | 0,045   |
| Ar <sup>1</sup> | 115,62±30,65*                                   | 132,59±16,16 | 138,02±40,83 | 162,53±40,98* | 146,14±0,77 | 0,044   |

3 A= Espermatogônia tipo A; S= células de Sertoli; PL= Espermatócitos primários em pré-  
 4 leptóteno/leptóteno; PQ= Espermatócitos primários em paquíteno; Ar= Espermátides  
 5 arredondadas. <sup>1</sup>= Os dados não apresentaram distribuição normal, e referem-se à mediana ±  
 6 intervalo interquartil. \* Indica diferença entre os tratamentos pelo teste de Dunnett, a 5% de  
 7 significância. <sup>2</sup>= Os dados apresentaram distribuição normal, e referem-se à média ± desvio  
 8 padrão.

9

10 O tratamento de 9% de glicerina bruta de baixa pureza, demonstrou ser a  
 11 melhor concentração, dentre as testadas, em relação a demanda de energia  
 12 disponibilizada para a espermatogênese. A substância nessa concentração  
 13 forneceu energia suficiente para maior sustentação dos PL, e por tratar-se de um  
 14 processo de estratificação vertical é naturalmente aceitável que as variáveis PQ  
 15 e Ar do mesmo tratamento também apresentem diferença.

16 Possivelmente, se houvessem mais tratamentos com níveis maiores de  
 17 gordura, que nesse caso foi glicerina bruta de baixa pureza, os valores  
 18 relacionados às contagens dos tipos celulares iriam decair, como foi descrito por  
 19 Luo et al., (2020), de forma que, dietas com 60% de gorduras durante 8  
 20 semanas, promoveu reduções drásticas nos índices relacionados à  
 21 espermatogênese, além da desconfiguração da estratificação vertical dos  
 22 túbulos seminíferos.

23 Entretanto, de forma geral, os resultados apresentados, em todos os  
 24 níveis da glicerina bruta de baixa pureza, são condizentes com os valores  
 25 descritos por Andreussi et al. (2013), para a raça Nelore, exceto a variável PL  
 26 apresentou um valor relativamente superior às descritas aqui (PL=38). Porém,  
 27 nesse caso, a diferença de idade dos animais utilizados na sua pesquisa pode  
 28 ter exercido influência.

29

30

1 No rendimento intrínseco da espermatogênese não houve variação em  
2 relação à presença ou mesmo à concentração de glicerina bruta de baixa pureza  
3 na dieta dos animais ( $P>0,05$ ) (Tab. 3).

4

5 Tabela 3. Rendimento intrínseco da espermatogênese de bovinos  
6 suplementados com glicerina bruta de baixa pureza no concentrado.

| Variáveis                | Níveis de inclusão de glicerina de baixa pureza (Razão) |                 |                |                 |                | P valor |
|--------------------------|---|-----------------|----------------|-----------------|----------------|---------|
|                          | 0%  | 3%              | 6%             | 9%              | 12%            |         |
| <b>A:PL<sup>1</sup></b>  | 1 : 14,14±2,44  | 1 : 12,67±2,43  | 1 : 12,23±1,90 | 1 : 14,39±2,10  | 1 : 12,20±0,03 | 0,179   |
| <b>PL:PQ<sup>2</sup></b> | 1 : 1,90±0,91   | 1 : 1,93±0,02   | 1 : 1,92±0,18  | 1 : 1,92±0,10   | 1 : 1,96±0,01  | 0,499   |
| <b>PQ:Ar<sup>1</sup></b> | 1 : 2,39±0,59   | 1 : 2,62±0,09   | 1 : 2,62±0,15  | 1 : 2,56±0,17   | 1 : 2,89±0,01  | 0,086   |
| <b>A:Ar<sup>1</sup></b>  | 1 : 65,86±10,90   | 1 : 64,08±13,34 | 1 : 63,81±6,34 | 1 : 70,98±12,49 | 1 : 69,08±0,16 | 0,661   |

7 A = Espermatogônia tipo A; PL= Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno; PQ =  
8 Espermatócitos primários em paquíteno; Ar = Espermátides arredondadas. <sup>1</sup>= Os dados  
9 apresentaram distribuição normal e referem-se à média ± desvio padrão. <sup>2</sup>= Os dados não  
10 apresentaram distribuição normal e referem-se à mediana ± intervalo interquartil. Não houve  
11 diferença entre os tratamentos pela ANOVA e Kruskal-Wallis a 5% de significância.

12

13 Assim como na contagem dos tipos celulares, os resultados referentes ao  
14 rendimento intrínseco da espermatogênese apresentados por Andreussi et al.  
15 (2013), referente à raça Nelore, foram diferentes nas variáveis relacionadas a  
16 variável PL, pelo mesmo motivo justificado anteriormente.

17 No estudo realizado por Rocha et al. (2020) utilizando ovinos, que apesar  
18 de ser uma espécie diferente apresenta os parâmetros espermatogênicos  
19 similares aos dos bovinos, foi encontrado os seguintes valores para o rendimento  
20 intrínseco da espermatogênese: A:PL=16,98, PL:PQ=1,10, PQ:Ar=3,61 e  
21 A:Ar=65,99. O valor da variável PQ (15,16) foi inferior aos descritos aqui  
22 (PQ=53,29), o que pode estar associado a dinâmica de ondas de  
23 desenvolvimento da espermatogênese (Perey et al., 1967) (Tab. 3).

24 A relação entre células de Sertoli e demais tipos celulares do epitélio  
25 seminífero também não apresentaram diferenças em relação aos tratamentos  
26 ( $P>0,05$ ) (Tab. 4).

27 Resultados descritos por Silva et al. (2020) demonstraram que o  
28 rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de células de Sertoli em  
29 touros da raça Gir foram similares aos descritos neste estudo, assim como os  
30 dados apresentados por Andreussi et al. (2013). De tal forma, é possível sugerir  
31 que a utilização da glicerina bruta de baixa pureza, na concentração de até 12%

1 da suplementação concentrada de touros não interfere nos aspectos  
2 morfométricos supracitados.

3

4 Tabela 4. Índices de células de Sertoli de bovinos suplementados com glicerina  
5 bruta de baixa pureza no concentrado.

| Variáveis   | Níveis de inclusão de glicerina de baixa pureza |                |                |                |                | P<br>valor |
|-------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
|             | 0%  | 3%             | 6%             | 9%             | 12             |            |
| <b>S:A</b>  | 1 : 0,45±0,05                                   | 1 : 0,48±0,05  | 1 : 0,46±0,04  | 1 : 0,44±0,03  | 1 : 0,45±0,00  | 0,265      |
| <b>S:PL</b> | 1 : 6,26±0,71                                   | 1 : 6,16±1,17  | 1 : 5,65±0,72  | 1 : 6,27±0,72  | 1 : 5,55±0,01  | 0,291      |
| <b>S:PQ</b> | 1 : 12,86±3,61                                  | 1 : 11,86±2,17 | 1 : 11,26±0,75 | 1 : 12,05±1,63 | 1 : 10,87±0,04 | 0,511      |
| <b>S:Ar</b> | 1 : 29,31±4,50                                  | 1 : 31,13±6,25 | 1 : 29,52±1,90 | 1 : 30,88±4,36 | 1 : 31,45±0,06 | 0,833      |
| <b>S:CG</b> | 1 : 48,88±7,37                                  | 1 : 49,64±9,58 | 1 : 46,90±3,13 | 1 : 49,64±6,55 | 1 : 48,33±0,07 | 0,936      |

6 S= Células de Sertoli; A= Espermatogônia tipo A; PL= Espermatócitos primários em  
7 pré/leptóteno; PQ = Espermatócitos primários em paquíteno; Ar= Espermatídes arredondadas;  
8 CG= Contagem geral da somatória de todos os tipos celulares exceto células de Sertoli. Os  
9 dados apresentaram distribuição normal e referem-se à média ± desvio padrão. Não houve  
10 diferença entre os tratamentos pela ANOVA a 5% de significância.

11

12 Em relação às estimativas do número total de células de Sertoli e  
13 produção e reserva espermática diária, houve diferença apenas para a  
14 estimativa da PED/g testicular (P=0,024) entre o tratamento controle e com 9%  
15 de glicerina bruta de baixa pureza na dieta, com superioridade desta última (Tab.  
16 5), sem diferença para as demais variáveis.

17

18 Tabela 5. Estimativas da produção espermática e de células de Sertoli total e por  
19 grama de testículo de bovinos suplementados com glicerina bruta de baixa  
20 pureza no concentrado.

| Variáveis                                   | Níveis de inclusão de glicerina de baixa pureza |                          |                          |                          |                          | P<br>valor |
|---|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|
|   | 0%  | 3%                       | 6%                       | 9%                       | 12%                      |            |
| <b>NTCS (x10<sup>9</sup>)<sup>1</sup></b>   | 26,91±6,51                                      | 21,98±11,48              | 29,22±9,98               | 32,35±5,90               | 24,76±4,97               | 0,268      |
| <b>NTCS/g (x10<sup>6</sup>)<sup>1</sup></b> | 99,81±17,00                                     | 102,08±32,33             | 117,90±47,92             | 115,33±16,82             | 101,85±4,30              | 0,700      |
| <b>PED (x10<sup>9</sup>)<sup>1</sup></b>    | 11,74±5,15                                      | 9,56±2,17                | 12,16±2,19               | 17,02±5,99               | 13,47±3,28               | 0,069      |
| <b>PED/g (x10<sup>6</sup>)<sup>2</sup></b>  | 43,66±19,86 <sup>b</sup>                        | 46,93±9,07 <sup>ab</sup> | 48,18±4,26 <sup>ab</sup> | 59,33±13,02 <sup>a</sup> | 55,09±7,10 <sup>ab</sup> | 0,024      |
| <b>RET (x10<sup>9</sup>)<sup>1</sup></b>    | 785,59±219,87                                   | 644,59±256,22            | 866,28±302,65            | 1016,26±314,85           | 778,85±156,84            | 0,214      |
| <b>RET/g (x10<sup>9</sup>)<sup>1</sup></b>  | 2,89±0,44                                       | 3,04±0,58                | 3,48±1,40                | 3,55±0,60                | 3,20±0,13                | 0,538      |

21 NTCS = Número total de células de Sertoli, PED = Produção espermática diária, RET = Reserva  
22 espermática testicular. <sup>1</sup>= Os dados apresentaram distribuição normal, e referem-se à média ±  
23 desvio padrão. <sup>2</sup>= Os dados não apresentaram distribuição normal, e referem-se à mediana ±  
24 intervalo interquartil. Letras diferentes na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste  
25 ajustado de Kruskal-Wallis, a 5% de significância.

1  
2 No estudo realizado por Berndston et al. (1987) foi encontrado valores  
3 semelhantes para a NTCS ( $27,12 \times 10^6$ ), porém, para a variável PED/g o valor foi  
4 inferior aos descritos aqui ( $11,2 \times 10^6$ ). Entretanto, possivelmente, essa situação  
5 se justifica pela idade dos touros utilizados que estavam próximos a  
6 senescência, com 99 meses.

7 Já Swierstra (1966) encontrou o valor de  $16,9 \times 10^6$  para PED/g, sendo um  
8 valor inferior aos descritos aqui. Contudo, devido ao fator da raça e clima, os  
9 valores descritos para a contagem de células de Sertoli (2,04) e  
10 espermatogônias tipo A (0,62) também foram inferiores, justificando a diferença  
11 entre os resultados.

12 A flutuação no número de células de Sertoli pode promover alterações  
13 proporcionais relacionados a PED/g (Berndston et al., 1987). Entretanto, aqui  
14 não houve diferença no número total de células de Sertoli entre os tratamentos,  
15 indicando que as diferenças apresentadas em PED/g não se relacionam com  
16 esse fator.

17 A diferença apresentada em PED/g do tratamento de 9% de glicerina bruta  
18 de baixa pureza é reflexo do aumento na contagem dos tipos celulares meióticos  
19 do grupo (Tab. 2), pois, essas células são precursoras dos espermatozoides, e  
20 são as unidades utilizadas para calcular o PED/g

### 21 22 **4.3 CONCLUSÃO**

23  
24 A suplementação de touros com glicerina bruta de baixa pureza na  
25 concentração de 9%, promoveu uma melhora no número de células da linhagem  
26 germinativa, sem impacto no rendimento intrínseco da espermatogênese, mas  
27 com aumento na produção espermática diária por grama de parênquima  
28 testicular.

### 29 30 **4.4 REFERÊNCIAS**

31  
32 ANDREUSSI, P.A.T.; COSTA, D.S.; FARIA, F.J.C. et al. Efficiency of  
33 spermatogenesis in zebu bulls (*Bos taurus indicus*). *Anat. Hist. Emb.*, v. 45, p.  
34 133-140, 2013.

- 1 AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII.  
2 Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. **J. Dair. Scie.**,  
3 v. 45, p.774-781, 1962.  
4
- 5 BERDSTON, W.E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. relationship of absolute  
6 numbers of sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef  
7 bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 64, p. 241-246, 1987.  
8
- 9 CUI, L.; GUAN, Q. Regulation of lipid metabolism in rat leydig cells testosterone  
10 synthesis and proliferation. **Inter. J. Clin. Exper. Med.**, v. 9, p. 8224-8229, 2016.  
11
- 12 CRISOSTOMO, L.; ALVES, M.G.; CALAMITA, G.; SOUSA, M.; OLIVEIRA, P.F.  
13 Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. **Mol. Hum. Rep.**  
14 v. 23, p. 725-737, 2017.  
15
- 16 LUNA, L.G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces**  
17 **Institute of Pathology**. Third Edition. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.  
18
- 19 LUO, D.; ZHANG, M.; SU, X.; LIU, L.; ZHOU, X.; ZHANG, X.; ZHENG, D.; YU,  
20 C.; GUAN, Q. Hight fat diet impairs spermatogenesis by regulation glucose and  
21 lipid metabolism in Sertoli cells. **Life Sci.** v. 252, p. 1-8, 2020.  
22
- 23 MARQUES, J.A.; PRADO, I.N.; ZEOULA, L.M. et al. Avaliação da substituição  
24 do milho pela mandioca e seus resíduos na digestibilidade aparente em novilhas  
25 confinadas. **Rev. Inic.**, v.1, p.37-43, 2002.  
26
- 27 MCLANCHLAN, R.I.; WREFORD. N.G.; MEACHEM, S.J. et al. Effects of  
28 testosterone on spermatogenic cell population in the adult rat. **Biol. Reprod.**, v.  
29 51, p. 945-955, 1994.  
30
- 31 MURPHEY, B.M.; CROSSON, P.; KELLY, A.K. et al. Animal performance and  
32 economic implications of alternative production systems for dairy bulls  
33 slaughtered at 15 months of age. **Irish J. Agri. and Food Res.**, v. 56, p. 93-103,  
34 2017.  
35
- 36 **NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NUTRIENT REQUIREMENTS OF**  
37 **SMALL RUMINANTS)**. Washigton, d.c.: National Academy Press, 362 p, 2007.  
38
- 39 PEREY, B.Y.; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. The wave of the seminiferous  
40 epithelium in the rat. **Amer J. of Anat.**, v. 108, p. 47-77, 1961.  
41
- 42 REVIERS, M.T.H.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology 45 of the  
43 testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **J. Repr. and Fert.**, v. 54, p. 209-213,  
44 1978.  
45
- 46 REVIERS, M.T.H.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. Spermatogenesis and  
47 Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.  
48 34, p.101-114, 1987.  
49



- 1 RODRIGUES, A.N.; RUIZ, C.M.; NARDO, C.D.D et al. Effect of dietary  
2 supplementation with omega-3 and-6 on fresh and frozen/thawed sperm quality.  
3 **Semina**, v.38, p. 3069-3076, 2017.  
4
- 5 RUTKOWSKA, K.; RECZYNSKA, D.; LUCASZEWICZ, M. et al. Effects of diet on  
6 the expression of lipid metabolism signaling genes in the longissimus dorsi  
7 muscle of Polish Holstein bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 94, p. 62-72, 2016.  
8
- 9 SHI, J.; LI, Y.; REN, K.; XIE, Y.; YIN, W.; MO, Z. Characterization of cholesterol  
10 metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis (Review). **Mol. Med. Rep.** v.  
11 17, p. 705 -713, 2017.  
12
- 13 SILVA, D. F. M.; FARIA, F. J. C.; FURTADO, F. H. G. et al. Functional  
14 morphology of the spermatogenesis in gir bulls. **Agirc. Sci.** v. 11, p. 1-14, 2020.  
15
- 16 STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: spermatogenesis in bull. **Animal**, v.12, p.27-  
17 35, 2018.  
18
- 19 STRADA, E.S.O.; SILVA, R.R.; BARBOSA, L.P. et al. Analise espermática e  
20 testicular de touros nelore suplementados com glicerina bruta. **Med. Vet.**  
21 **UFRPE**, v. 13, p. 613-619, 2020.  
22
- 23 STRADA, E.S.O.; SILVA, R.R.; CARVALHO, G.G.P. et al. Glicerina de baixa  
24 pureza na suplementação de bovinos terminados a pasto: análise bioeconômica.  
25 **Semina**, v. 36, p. 2195-2209, 2015.  
26
- 27 STRADA, E.S.O.; SILVA, R.R.; CARVALHO, G.G.P. et al. Fatty acid composition  
28 of beef cattle finished on tropical pasture and supplemented with crude glycerin.  
29 **Semina**, v. 40, p. 993-1000, 2019.  
30
- 31 WROBEL, K.H.; BICKEL, D.; KUJAT, R. et al. Configuration and distribution of  
32 bovine spermatogonia. **Cell Tiss. Res.**, v. 279, p. 277-289, 1995.  
33  
34  
35

## 1 **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3

4 Os ingredientes estudados demonstraram potencial para compor o  
5 suplemento concentrado das espécies estudadas. De forma parcial, os insumos  
6 não representam podem ser oferecidos aos animais sem que haja prejuízos  
7 relacionados à espermatogênese.

8 A suplementação com farelo de cacau até o nível de 12,27% no  
9 concentrado melhorou o NTCS e em até 12,45% o PED e o RET de ovinos.

10 A suplementação com glicerina bruta de baixa pureza na concentração de  
11 9% na alimentação de bovinos promoveu aumento no número de células da  
12 linhagem germinativa, sem impacto no rendimento intrínseco da  
13 espermatogênese, ou nos índices de células de Sertoli, mas com aumento na  
14 produção espermática diária.

15

## 1 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

3

4 ADAMAFIO, N.A. 2013. Theobromine toxicity and remediation of cocoa By:products: an  
5 overview. **Journal of Biological Science** 13:570-576.

6 AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. **Journal of**  
7 **Animal Science** 57:380-403.

8 APRIOKU, J.S.; BOMS, R.; IF-TUBIYELE. 2020. Effect of simultaneous coffee/caffeine and  
9 ethanol administration on sperm quality and reproductive hormones: an experimental study in  
10 Sprague Dawley rats. **Drug and Chemical Toxicology** 10:1-9.

11 BAE, J.; CHOI, H.; CHOI, Y.; ROH, J. 2017. Dose- and time-related effects of caffeine on the  
12 testis in immature male rats. **Toxicology** 66:29-39.

13 BILASPURI. G.S.; GURAYA, S.S. 1986. The seminiferous cycle and spermatogenesis in rams  
14 (*Ovis aries*). **Theriogenology** 25:485-505.

15 BONGSO, T.A.; JAINUNDEEN, M.R.; ZAHRAH, A.S. Relationship of scrotal circumference to age,  
16 body weight and onset of spermatogenesis in goats. **Theriogenology**, 18:513-524, 1982.

17 BOUJRAD, N.; REVIERS, T.H.; CARREAU, S.; 1995. Evidence for germ cell control of Sertoli  
18 cell function in the three models of germ cell depletion in adult rat. *Biology of Reproduction*  
19 53:1345-1352.

20 BERNDSTON, W.E, IGBOELI, G.; PARKER, W.G. 1987. The numbers of Sertoli cells in mature  
21 Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biology of**  
22 **Reproduction** 37:60–67.

23 CARDOSO, A.M.; ALVES, M.G.; MATHUR, P.P.; OLIVEIRA, P.F.; CAVACO, J.E.; RATO, L.  
24 2017. Obesogens and male fertility. **Obes Rev** 1:109-125.

25 CARVALHO, G.G. P.; PIRES, A.J.V.; SILVA. R.R.; RIBEIRO, L.S.O.; CHAGAS, D.M.T. 2006.  
26 Desempenho e digestibilidade de ovinos alimentados com farelo de cacau (theobroma cacao  
27 L.) em diferentes níveis de substituição. **Ciência Animal Brasileira** 7:115-122.

28 CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; SILVA. R.R.; RIBEIRO, L.S.O.; CHAGAS, D.M.T. 2008.  
29 Ingestive comportamento on Santa Ines sheeps fed diets with cocoa meal. **Revista Brasileira**  
30 **de Zootecnia** 37:660-665.

31 CAVALCANTE, F.S.; AICELES, V.; MORAIS, D.F.S.; ALVES-PEREIRA, J.L.; FARIA, T.S.;  
32 RAMOS, C.F. 2014. The testis of the mice C57/BL6 offspring in adulthood have alterations due  
33 to maternal caffeine consumption. **Acta Cirurgica Brasileira** 29:16-23.

34 Centro de Inteligência da Carne Bovina [CIRCARNE]. 2020. **Projeções para o mercado da**  
35 **carne bovina 2020-2029**. Embrapa, Brasil.

36 CIGANKOVA, V. 1983. Prenatal and postnatal development of Sertoli cells in rams. **Veterinari**  
37 **Medicina** 28:613-620.

38 CRISOSTOMO, L.; ALVES, M.G.; CALAMITA, G.; SOUSA, M.; OLIVEIRA, P.F. 2017. Glycerol  
39 and testicular activity: the good, the bad and the ugly. **Molecular Human Reproduction**  
40 23:725-737.

41 CUI, L.; GUAN, Q. 2016. Regulation of lipid metabolism in rat leydig cells testosterone synthesis  
42 and proliferation. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, 9:8224-8229.

43 CUPPS, P.T. LABEN, R.C. 1960. Spermatogenesis in Relation to Spermatozoa Concentration  
44 in Bovine Semen. **Journal of Dairy Science**, 43:782–786.

45 DENG, K.; DIAO, Q.; JIANG, C.; TU, Y.; ZHANG, N.; LIU, J.; MA, T.; ZHAO, Y.; ZU, G. 2012.  
46 Energy Requirements for Maintenance and Growth of German Mutton Merino Crossbred  
47 Lambs. **Journal of Integrative Agriculture** 12:670-677.

- 1 DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; EMERICK, L.L., VALE FILHO, V.R. 2008.  
2 Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros  
3 da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43:53-59.
- 4 EKSTEDT, B. E.; SODERQUIST, L.; PLOEN, L. 1986. Fine structure of spermatogenesis and  
5 Sertoli cells (*Epitheliocytyus sustentans*) in the bull. **Anatomy, Histology and Embriology**  
6 15:23-48.
- 7 ENG, F.; WIEBE, J.P.; ALIMA, L.H. 1994. Long-term alterations in the permeability of the blood  
8 testis barrier following a single intramuscular injection of dilute aqueous glycerol. **Journal of**  
9 **Andrology** 4:311-317.
- 10 ETENG, M.U.; EYONG, E.U.; AKPANYUNG, E.O.; AGIANG, M.A.; AREMU, C.Y. 1997. Recent  
11 advances in caffeine and theobromine toxicities :a review. **Plants Food for Human Nutrition**  
12 51:231-243.
- 13 FAO, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. 2015. **Meat and Meat**  
14 **Products: price and trade update.**
- 15 FUNABASHI, H.; FUJIOKA, M.; KOHCHI, M.; TATEIHSI, Y.; MATSUOKA N. 2000.  
16 Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated deoses studies  
17 in rats: effects of 2 and 4 week administration of teobromine on the testis. **The Journal of**  
18 **Toxicological Sciences** 25:211-221.
- 19 GABRIELSEN, J.S.; TANRICUT, C. 2016. Chronic exposures and male fertility: the impacts of  
20 environment, diet, and drug use on spermatogenesis. **Andrology** 1-14.
- 21 GUAN, Y.; LIANG, G.; HAWKEN, P.A.R.; MEACHEM, S.J.; MALECKI, I.A.; HAM, S.;  
22 STEWART, T.; GUAN, L.L. MARTIN, G.B. 2016. Nutrition affects Sertoli cell function but not  
23 Sertoli cell numbers in sexually mature male sheep. **Fertility, Reproduction and Development**  
24 28:1152-1163.
- 25 JOHNSON, L. 1985. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is  
26 explained by an elevated population of spermatogonia. **Biology of Reproduction** 32:1181-  
27 1190.
- 28 JOHNSON, L, 1986. Review article: Spermatogenesis and aging. **Journal of Andrology**  
29 7:331-354.
- 30 JOHNSON L. et al., 2000. Efficiency on spermatogenesis: a comparative approach. **Animal**  
31 **Reproduction Science** 61:471-480.
- 32 KREHBIEL, C. R. 2008. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal**  
33 **Science** 86:392-400.
- 34 LEAL, M.C., BECKER-SILVA, S.C., CHIARINI-GARCIA, H., FRANÇA, L.R. 2004. Sertoli cell  
35 efficiency and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). **Animal Reproduction** 1:122-  
36 128.
- 37 LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H. 2003. Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to  
38 exogenous trans10, cis12-cla in cows fed oleic or linoleic oil. **Journal of Dairy Science** 86:1354-  
39 1369.
- 40 LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. 1992. Factors that  
41 affect ovarian follicular dinamics in cattle. **Journal Animal Science** 70:3615-3626.
- 42 MARTINS, J.A.M.; SOUZA, C.E.A.; CAMPOS, A.C.N.; AGUIAR, G.V.; LIMA, A.C.B.; ARAUJO,  
43 A.A.; NEIVA, J.N.M. MOURA, A.A.A. 2008. Measurements of reproductive traits and  
44 spermatogenesis in crosbread hairy rams. **Archivos de Zootecnia** 222: 253-256.
- 45 NICOLET, H.P.M.; JUTTE, R.; JANSEN, J.A.; GROOTEGOED, F.F.G.; ROMMERTS, O.P.F.;  
46 MOLEM, H.J. 1982. Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactae supply for  
47 Setoli cells. **Journal Reproduction and Fertility** 65:431-438.
- 48 NOGUEIRA, B. P. 2013. CACAU AMÊNDOA. **Perspectivas Agropecuárias** 1:1-154.
- 49 NUNES, I. 1998. **Cálculo e avaliação de rações e suplementos** Roca, Belo Horizonte, Minas  
50 Gerais.

- 1 OLEJNIK, J.; SUCHOWERSKA, N.; HERRID, M.; JACKSON, M.; HINCH, G.; HILL, J. 2018.  
 2 Spermatogonia survival in young ram lambs following irradiation, Busulfan or termal treatment.  
 3 **Small Ruminant Research** 166:22-27.
- 4 OLIVEIRA, J.S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C.; MÜLLER, M.D. 2013. Composição química  
 5 da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação  
 6 animal. **Ciência Rural**, 43:509-512.
- 7 PARK, M.; CHOI, Y.; CHOI, H.; YIM, J.; ROH, J. 2016. High Doses of Caffeine during the  
 8 Peripubertal Period in the Rat Impair the Growth and Function of the Testis. **International**  
 9 **Journal of Endocrinology** 2016:1-9.
- 10 PEREY, B.Y.; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. 1961. The wave of the seminiferous epithelium  
 11 in the rat. **American Journal of Anatomy**, 108:47-77.  
 12
- 13 PIRES, A. J. V.; et al. 2004. Farelo de cacau (*Theobroma cacao*) na alimentação de ovinos.  
 14 **Revista Ceres**, 26:33-46.
- 15 POLLARD, I.; LOCQUET, O.; SOLVAR, A.; MAGRE, S. 2001. Effects of caffeine and its  
 16 reactive metabolites theophylline and theobromine on the differentiating testis. 13:435-441.
- 17 RAVIERS, M.T.H.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. 1987. Spermatogenesis and Sertoli cell  
 18 numbers and function in rams and bulls. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**  
 19 34:101-114.
- 20 RODRIGUES, R.T.G.A.; SANTOS, J.R.S.; AZEREDO, A.M.S.; ROCHA, E.F.; CARVALHO,  
 21 M.A.M.; PORTAL, M.J.I.D.; SOUSA, O.B.; MENEZES, D.J.A. 2016. Influence of scrotal  
 22 bipartition on spermatogenesis yield and Sertole cell efficiency in sheep. **Pesquisa Veterinaria**  
 23 **Brasileira** 36:258-262.
- 24 ROCHA, L.F.; RIBEIRO, M.O.; SANTANA, A.L.A.; JESUS, R.D.L.; SOUZA, R.S.; BAGALDO,  
 25 A.R.; ARAUJO, F.L.; BARBOSA, L.P. 2020. Spermatogenesis in sheep supplemented with  
 26 detoxified castor bean (*Ricinus communis* L.) as a replacement for soybean meal. **Revista**  
 27 **Brasileira de Saúde e Produção Animal** 21:13-21.
- 28 ROSS, A.D.; ENTWISTLE, K.W. 1979. The effect of scrotal insulation on spermatozoal  
 29 morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the  
 30 bull. **Theriogenology** 11:111-129.
- 31 SANTOS, R.A.; VARGAS JUNIOR, F.M.; SENO, L.O.; ORRICO, A.C.; BOTTINI FILHO, F.D.E.;  
 32 SENEGALHE, F.B.; CANSIAN, K.; LONGO, M.L. Biometria testicular de ovinos Pantaneiros  
 33 alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta na dieta. *Revista Brasileira de Saúde e*  
 34 *Produção Animal*, 17(2):311-321, 2016.
- 35 SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K, H. 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets  
 36 for ruminants. In: **INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS**, 10, 1999, Canberra. Gosford,  
 37 Australia: Regional Institute.
- 38 SOUSA, F.M.L.; et al. 2014. Parameters of the Reproductive Tract, Spermatogenesis, Daily  
 39 Sperm Production and Major Seminal Plasma Proteins of Tropically Adapted Morada Nova  
 40 Rams. **Reproduction in Domestic Animals** 49:409-419.
- 41 SOUZA, R.S.; BARBOSA, L.P.; PINHEIRO, A.M.; MACHADO, W.M.; MENDES, C.S.; ARAUJO,  
 42 M.L.; SOUZA, D.O.; SANTANA, A.L.A. 2019. Semen quality and metabolic profile of goats fed  
 43 flaxseed in the diet. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 71:899-908.
- 44 STAUB, C.; JOHNSON, L. 2018. Review: spermatogenesis in bull. **Animal** 12:27-35.
- 45 STRADA, E.S.O.; SILVA, R.R.; BARBOSA, L.P.; CARVALHO, G.G.P.; LEITE, L.C.; LEITE,  
 46 M.C.P.; VIEIRA, R.L.A.; LIMA JUNIOR, D.M. Análise espermática e testicular de touros Nelore  
 47 suplementados com glicerina bruta. **Medicina Veterinária (UFRPE)** 13:613-619.
- 48 STRADA, E.S.O.; SILVA, R.R.; CARVALHO, G.G.P.; BARBOSA, L.P.; PRADO, I.N.; ARAÚJO,  
 49 F.L.; MATOS, L.H.A.; CRUZ, O.T.B.; LIMA JÚNIOR, D.M. 2019. Fatty acid composition of beef  
 50 cattle finished on tropical pasture and supplemented with crude glycerin. **Semina-Ciencias**  
 51 **Agrarias**40:993-1000.

- 1 TARKA, S. M. J. ZOUMAS, B. L.; GANS, J. H. 1981. Effects of continuous administration of  
2 dietary treobomine on rat testicular wheit and morphology. **Toxicological Applied**  
3 **Phamacology** 58:76-82.
- 4 VERDE, A.A.; CUCOLO, M.C.; OLIVEIRA, M.L.C.; CAVALLIERI, L.F.B.; ANDREAZZI, M.A.;  
5 EMANUELLI, I.P. 2019. Sustanabe destination of artisanal brewery waste: a case study in pig  
6 farm. **Valore** 4:89-93.
- 7 WANG, Y.; WALLER, D.P.; HIKIM, A.P.S.; RUSSEL, L.D. 1992. Reproductive toxicity of  
8 theobromine and cocoa extract in male rats. *Reproductive Toxicology* 6:347-353.
- 9 WANG, Y.; WALLER, D. P. 1994. Theobromine toxicity on Sertoli cells and comparison with  
10 cocoa extract in male rats. **Toxicology Letters** 70:155-164.
- 11 WIKER, R.; STUART, S.; HOWARDS, M.D. 1977. Micropuncture studies of the motility of rete  
12 testis and epididymal spermatozoa. **Fertility and Sterelity** 28:108-112.
- 13 WIEBE, J.P.; KOWALIK, A.; GALLARDI, R.L.; EGELER, O.; CLUBB, B.H. 2000. Glycerl disrupt  
14 tight junction-associated actin microfilaments, occludin and microtubules in Sertoli cells.  
15 **Journal of Andrology** 5:625-635.
- 16 YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN, R. 2012. Value-added uses for crude glycerol –a byproduct of  
17 biodiesel production. **Biotechnology of Biofuels** 5:1-10.
- 18 YANG, H.; MA, J.; WAN, Z.; WANG, Q.; WANG, Z.; ZHAO, J.; WANG, F.; ZHANG, Y. 2020.  
19 Characterization of sheep spermatogenesis single-cell RNA sequecing. **The Faseb Journal**  
20 35:1-13.
- 21

- 1
- 2
- 3
- 4

## **APÊNDICES**

## ITENS EXIGIDOS

1  
2  
3

|   |                    |
|---|--------------------|
| <b>PARTE EXTERNA</b>                                      |                    |
| CAPA  | <b>Obrigatório</b> |
| <b>PARTE INTERNA – ELEMENTOS PRÉ – TEXTUAIS</b>           |                    |
| FOLHA DE ROSTO  | <b>Obrigatório</b> |
| FOLHA DA COMISSÃO EXAMINADORA                             |                    |
| DEDICATÓRIA   | Opcional           |
| AGRADECIMENTOS  |                    |
| EPIGRAFE  |                    |
| TÍTULO/RESUMO/PALAVRAS CHAVE                              | <b>Obrigatório</b> |
| TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS                                   | Opcional           |
| LISTA DE ABREVIATURAS, FIGURAS, QUADROS E/OU TABELAS      |                    |
| SUMÁRIO   |                    |
| <b>PARTE INTERNA – ELEMENTOS TEXTUAIS</b>                 |                    |
| <b>FORMA CONVENCIONAL</b>                                 |                    |
| INTRODUÇÃO (com Hipótese e Objetivos)                     | <b>Obrigatório</b> |
| REVISÃO DE LITERATURA                                     |                    |
| MATERIAL E MÉTODOS  |                    |
| RESULTADOS PARCIAIS OU FINAIS                             |                    |
| DISCUSSÃO   |                    |
| CONCLUSÃO   | Opcional           |
| <b>FORMA DE ARTIGOS/CAPÍTULOS</b>                         |                    |
| INTRODUÇÃO (com Hipótese e Objetivos)                     | <b>Obrigatório</b> |
| REVISÃO DE LITERATURA                                     |                    |
| CAPÍTULO 1 – Artigo 1                                     |                    |
| CAPÍTULO 2 - Artigo 2 (quando for o caso)                 | Opcional           |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS                                      |                    |
| <b>PARTE INTERNA – ELEMENTOS PÓS – TEXTUAIS</b>           |                    |
| REFERÊNCIAS   | <b>Obrigatório</b> |
| APÊNDICES   |                    |
| ITENS EXIGIDOS  |                    |
| IMPACTO CIENTÍFICO  |                    |
| NORMA DO PERIÓDICO (quando na forma de artigos/capítulos) |                    |
| INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES                                | Opcional           |

4  
5



## IMPACTO CIENTÍFICO

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

A pesquisa realizada forneceu informações relevantes sobre os impactos gerados na utilização de fontes alimentares alternativa sobre os aspectos reprodutivos de ruminantes.

Os resultados obtidos serão descritos em artigos científicos que serão submetidos a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, de Qualis B1 na área de Zootecnia/Recursos pesqueiros. Além disso, também serão publicados resumos em congressos relacionados à reprodução animal.

## NORMA DO PERIÓDICO

1  
2  
3

### 4 **Formatação do texto**

5 O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser  
6 apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 2), no formato  
7 A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no  
8 tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do  
9 título às referências), com linhas numeradas.

10 Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir,  
11 obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto,  
12 substância, empresa e país.

### 13 **Seções de um artigo**

14 **Title:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50  
15 palavras.

16 **Authors and Affiliation:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número  
17 do ORCID (de todos os autores) e com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e  
18 o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page”  
19 (Step 6), em arquivo Word.

20 **Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras  
21 em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os  
22 principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve  
23 conter uma informação completa.

24 **Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco e no mínimo duas\*.  
25 \* na submissão usar somente o Keyword (Step 3) e no corpo do artigo constar tanto keyword  
26 (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for  
27 submetido.

28 **Introduction:** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a  
29 pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente  
30 para balizá-la.

31 **Material and Methods:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos  
32 métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que  
33 envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar**  
34 **obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê  
35 de Ética).

36 **Results:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

37 **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais  
38 na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra  
39 Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto,  
40 a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1),  
41 mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em  
42 espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A  
43 legenda de tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento, mas deve ser

1 completa o suficiente para ser entendida independente do texto principal.. As tabelas devem ser  
2 obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

3 **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia,  
4 gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do  
5 número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig  
6 seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.:  
7 Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser  
8 enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio  
9 de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no  
10 corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.  
11 **Nota:** Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda,  
12 informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve  
13 figurar nas Referências.

14 **Discussion:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e  
15 Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma  
16 das partes).

17 **Conclusions:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem  
18 apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e  
19 especulações.

20 **Acknowledgements:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

21 **References:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência  
22 a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser  
23 referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as  
24 normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

25 **Como referenciar:**

26 **Citações no texto**

27 A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do  
28 texto, conforme exemplos:

- 29 • autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- 30 • dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- 31 • mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- 32 • mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne,  
33 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e  
34 alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

35 **Citação de citação.** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original.  
36 Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No  
37 texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação,  
38 seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas  
39 Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

40 **Comunicação pessoal.** Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do  
41 autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

42 **2. Periódicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

43 ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

- 1 FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in  
2 foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.
- 3 HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med.*  
4 *Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.
- 5 **3. Publicação avulsa** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três  
6 autores *et al.*):
- 7 DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.
- 8 LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In:  
9 CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São  
10 Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).
- 11 MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo.  
12 México: UTEHA, 1967. p.400-415.
- 13 NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.
- 14 SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de*  
15 *corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária,  
16 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 17 **4. Documentos eletrônicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três  
18 autores *et al.*):
- 19 QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary  
20 Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr.  
21 2000.
- 22 JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994.  
23 Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em:  
24 5 dez. 1994.
- 25
- 26