

Marina González Ledesma

**EXAME ANDROLÓGICO DE TOUROS A CAMPO COM
UTILIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO ISPERM**

Orientadora: Prof.^a Doutora Mariana Raposo Batista

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Marina González Ledesma

**EXAME ANDROLÓGICO DE TOUROS A CAMPO COM
UTILIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO ISPERM**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, no dia 27 de Julho de 2023, perante o júri, com o despacho de nomeação nº 309/2023, de 6 de julho de 2023, com a seguinte composição:

Presidente: Prof.^a Doutora Cátia Marques por delegação da Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof.^a Doutora Sofia Van Harten

Orientadora: Prof.^a Doutora Mariana Raposo Batista

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

A Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, um obrigada pela oportunidade.

A João Pedro Medalhas Serviços Veterinários Lda., como equipa, obrigada pela aprendizagem e acolhimento.

A JMPC. Lda., obrigada a todos e a cada um dos que forma parte da empresa e tive a sorte de conhecer.

Ao Dr. Ricardo Pais, pela ajuda, disponibilidade e por me ter facilitado os dados do meu estudo.

Aos professores, pelo apoio, compreensão e dedicação na nossa aprendizagem.

A professora Mariana, e ao mesmo tempo orientadora de tese, um obrigado gigante pela paciência e tempo dedicado e também pelo seu carinho.

Aos meus pais, Javier e Rosa, pela oportunidade, esforço e por nunca duvidar de mim.

Aos meus irmãos, Rosa e Javier, por ser e estar e por ser as únicas pessoas que quando os pés começam a sair do chão, vocês puxam com força para voltar á terra.

Ao meu cunhado, Miguel, por ser o melhor que me podia ter calhado.

Ao meu namorado João, por ser a pessoa que aguenta os meus piores dias, por acreditar que podia e por ser especial.

A minha família, pelo carinho.

As minhas ami-as, a vida com vocês é mais bonita.

A família que a faculdade me deu.

A Mer, por ser essa amiga que todos precisamos nas nossas vidas.

E para concluir, um obrigada ao céu, obrigada Professor Cannas, pela ajuda, dedicação e carinho, a qualquer hora, qualquer dia, em qualquer momento. Esta dissertação tem um pedaço de si. Obrigada por ser o professor que foi para todos nós.

Resumo

A eficiência reprodutiva é importante para que as explorações de bovinos de carne se mantenham rentáveis. A fertilidade do touro é um ponto importante, com grande impacto nos índices produtivos da exploração. Assim sendo, o exame andrológico a cada touro do efetivo torna-se fundamental a cada época reprodutiva para identificar animais inférteis e também subférteis, podendo eliminá-los da população reprodutora.

O presente estudo teve como objetivo demonstrar a eficácia do equipamento iSperm na realização de exames andrológicos a campo e identificar os parâmetros avaliados com este equipamento, que sejam importantes no exame andrológico, estudando as relações destes entre si.

Neste trabalho foram obtidos dados de exames andrológicos a campo em explorações de bovinos de carne no Alentejo nas épocas reprodutivas de 2019/20, 20/21 e 21/22. Estes exames consistiram num exame de estado geral do animal, exame direcionado ao aparelho reprodutor (com medição do perímetro escrotal) e avaliação de uma amostra seminal obtida por eletroejaculação. Em todos os exames o sémen foi avaliado com o equipamento iSperm.

Os 96 avaliados eram de várias raças, nomeadamente Limousine (n=53), Aberdeen-Angus (n=18), Outras (n=8) e os seus cruzamentos (n=12), tendo estes animais idades compreendidas entre os 16 meses e os 10 anos de idade.

Verificou-se uma diferença significativa do perímetro escrotal (PE) entre as diferentes raças estudadas, bem como uma correlação positiva deste com a idade e com a condição corporal (CC). Quanto ao sémen, verificou-se que a percentagem de formas anormais (FA) estava positivamente correlacionada com a idade do touro e negativamente correlacionada com a mobilidade massal (MM) e a mobilidade progressiva (MP).

O equipamento identificou vários tipos de FA, incluindo anomalias de cauda, cabeça e peça intermédia.

Todos os animais rejeitados (n=21) foram-no por avaliações de sémen insatisfatórias, sendo que animais inaptos tinham estatisticamente menos MM e MP e mais FA do que animais aptos.

Com a realização deste estudo conseguimos concluir que o equipamento iSperm é um equipamento rápido e eficaz na avaliação da amostra de sémen, fornecendo informação relevante sobre a sua qualidade para cada animal, permitindo determinar imediatamente e sem equipamento adicional se o animal é apto para a reprodução. Deve no entanto salvaguardar-se

que não deve ser conveniente ser o único elemento de análise para a determinação do valor reprodutivo do touro.

PALAVRAS CHAVE: Sêmen, touro, exame andrológico, iSperm

Abstract

Reproductive efficiency is very important to maintain economically viable beef cattle farms. Andrological examination of all the bulls of the herd at the beginning of the reproductive season allows for the identification and eventual culling of infertile or subfertile males, which would hinder overall reproductive efficiency.

The aim of this study was to demonstrate the effectiveness of the iSperm equipment in andrological evaluation in field conditions, identifying parameters relevant for the exclusion of inapt bulls.

The andrological examinations (AE) presented in this study were performed in extensive beef cattle farms in Alentejo during the reproductive seasons of 2019/20, 20/21 and 21/22. All AE were performed through a physical examination of the animal, examination of the reproductive organs (including scrotal circumference), and semen evaluation of a sample collected using electroejaculation. Semen was analysed using the iSperm equipment.

Scrotal circumference (SC) differed significantly between breeds and there was a significant positive correlation between the bull's SC and its age and body condition score (BC). Regarding the seminal exam, the percentage of abnormal forms (AF) correlated negatively with mass motility (MM) and progressive motility (PM). iSperm equipment was able to identify several types of AF, including anomalies in the tail, head and intermediate part. All rejected animals (n=21) had unsatisfactory semen evaluations, and rejected animals had statistically less MM and MP and more AF than approved animals.

With this study we can conclude that the iSperm equipment is a fast and effective tool in the evaluation of a semen sample, providing relevant information about its quality for individual animals, allowing the immediate decision to approve or reject a bull for reproduction, based on semen quality. However, it should be noted that semen evaluation alone (with or without iSperm) is not enough to perform a thorough AE and final decisions regarding overall reproductive soundness of the bull should not be made without a complete physical examination.

KEY WORDS: Semen, bull, andrological examination, iSperm

ÍNDICE GERAL

I.	Casuística	10
1.	Estágio em João Pedro Medalhas Serviços Veterinários	10
2.	Estágio em J.M.P.C Lda.	11
II.	Introdução	14
1.	Aparelho reprodutor masculino.....	14
1.1.	Anatomia do aparelho reprodutor masculino	14
1.2.	Função endócrina.....	18
2.	Exame Andrológico (EA).....	19
2.1.	Exame do estado geral	20
2.1.1.	Estatuto sanitário	20
2.1.2.	Aprumos	21
2.1.3.	Exame físico	21
2.2.	Exame dos órgãos reprodutores	21
2.2.1.	Testículos e epidídimo	21
2.2.2.	Perímetro escrotal (PE)	22
2.2.3.	Glândulas genitais acessórias	23
2.2.4.	Pénis	23
2.3.	Patologias do aparelho reprodutor masculino	24
2.4.	Colheita de sémen	25
2.5.	Avaliação do sémen	27
2.5.1.	Volume	28
2.5.2.	Cor	28
2.5.3.	Concentração	29
2.5.4.	Motilidade	30
2.6.	Morfologia dos espermatozóides	31
2.7.	Anatomia dos espermatozóides	32
2.8.	Formas anormais	33
III.	Objetivos	34
IV.	Materiais e métodos	34
V.	Resultados	36
5.1.	Exame do físico touro e aparelho reprodutor	36
5.2.	Avaliação do Sémen	38
5.3.	Avaliação global da aptidão reprodutiva dos animais	40
VI.	Discussão	41
VII.	Conclusão	44
VIII.	Bibliografia	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Casuística de ovinos	10
Tabela 2. Casuística bovinos	11
Tabela 3. Casuística JMPC Lda.	13
Tabela 4. Classificação por cor da amostra seminal	28
Tabela 5. Classificação motilidade massal	30
Tabela 6. Classificação motilidade individual	31
Tabela 7. Perímetro escrotal das raças estudadas	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia aparelho reprodutor masculino de bovino	14
Figura 2. Touro reprodutor raça Limousine	21
Figura 3. Medição do PE	23
Figura 4. Pénis com laceração	24
Figura 5. Sonda de eletroejaculador usada em bovinos (em baixo) e materiais usados na avaliação do sémen	25
Figura 6. Eletroejaculador e sonda	26
Figura 7. Colocação de sonda no reto	26
Figura 8. Recolha de sémen com controlo manual da intensidade de estimulação .	27
Figura 9. Recolha de sémen	28
Figura 10. Diferentes ejaculados	29
Figura 11. Ejaculado com urina	29
Figura 12. Espermatozóides ao microscópio x1000 com boa concentração	30
Figura 13. Espermatozóides ao microscópio x1000 com pouca concentração	30
Figura 14. Coloração com Eosina-Nigrosina	32
Figura 15. Partes do espermatozóide	33
Figura 16. Formas anormais primárias. (A: Spz normal, B: Defeito de gota distal, C: Defeito de cauda dobrada, D: Defeito tipo “Dag”)	34
Figura 17. Formas anormais secundárias (A: Spz normal, B: Cauda enrolada, C: Gota citoplasmática distal, D: Gota citoplasmática intermedia)	34
Figura 18. Equipamento iSperm	35
Figura 19. Cabeças destacadas	39
Figura 20. Cauda enrolada	39
Figura 21. Cauda curta	39
Figura 22. Cabeça piriforme e cauda em “U”	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Casuística por áreas J. P. Medalhas. Serviços Veterinários Lda.	11
Gráfico 2. Casuística por áreas JMPC. Lda.	14
Gráfico 3: Perímetro escrotal das raças	38
Gráfico 4: Número de touros com percentagem de FA	38

I. Casuística

O Estágio Curricular aqui apresentado foi realizado em dois locais diferentes. Durante os meses de novembro e dezembro de 2022, o estágio foi realizado em Monforte, em contexto de clínica de ambulatório, com acompanhamento dos trabalhos da empresa João Pedro Medalhas Serviços Veterinários Lda. A segunda parte do estágio foi realizada durante os meses de Janeiro e Fevereiro de 2023, na exploração JMPC. Lda., situada em Alcochete e sob a supervisão do Doutor João Paulo Salgueiro Camejo.

1. Estágio em João Pedro Medalhas, Serviços Veterinários

No estágio realizado em Monforte, a cada dia eram visitadas várias explorações onde se efetuavam vários serviços, maioritariamente na área de sanidade e alguns serviços de urgência e reprodução (Gráfico 1). Foram realizados trabalhos de maneio como a colocação de chips eletrónicos e brincos para a identificação e re-identificação dos ovinos. As espécies acompanhadas foram ovinas (Tabela 1) e bovinos (Tabela 2), tendo sido vistos cerca de 2.000 e 2.500 animais, respetivamente. Outros procedimentos realizados, foram o tratamento de ovinos com doença respiratória, claudicações e endometrites. No caso das vacas, além da sanidade, foram realizados a resolução de 3 partos distócicos com manobras tocológicas, 2 cesarianas, sincronização de cios a 50 animais, 600 ecografias para diagnóstico de gestação, 20 exames andrológicos, resolução de 1 prolapso uterino, 15 inseminações artificiais e 2 protocolos de superovulação com lavagem e congelação de 27 embriões.

Imunoprofilaxia	2000
Desparasitação Oral	1000
Colocação Brincos	500
Colocação Chips	500
Amostra de sangue para análise e sanidade	100
Tratamento Respiratório	50
Tratamento de Claudicação	20
Tratamento de Endometrite	5

Tabela 1: Casuística de ovinos

Plano Profilático (Vacinas e desparasitações)	2300
Amostra de sangue para análise e sanidade	2300
Ecografia retal para diagnóstico de gestação	600
Sincronização de cíos	50
Congelação de embriões	27
Recolha de embriões	27
Exame Andrológico	25
Inseminação Artificial	15
Resolução não cirurgica de partos distócicos	3
Cesarianas	2
Protocolos de Superovulação	2
Resolução de Prolapso Uterino	1
Lavagem Uterina para recolha de embriões	1

Tabela 2: Casuística bovinos

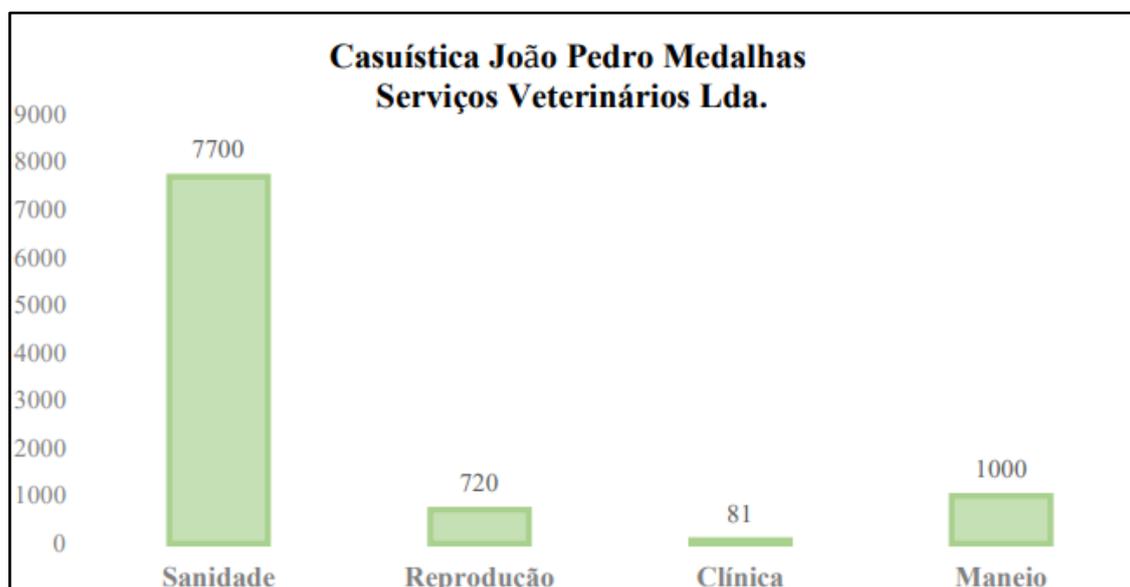


Gráfico 1: Casuística por áreas J. P. Medalhas. Serviços Veterinários Lda.

2. Estágio no JMPC. Lda.

No concelho de Alcochete, a espécie mais observada foi a bovina, tendo sido também observados alguns casos clínicos em suínos (Gráfico 2). Foram efetuadas diferentes tarefas entre as quais estão 1.457 planos de profilaxia, 35 exames andrológicos (EA), 115 ecografias para diagnóstico de gestação, 115 palpções retais, 5 partos, 1 resolução de prolapso vaginal,

38 protocolos de fluidoterapia em vitelos, 23 recolhas de amostras de sangue para análise e sanidade, 45 sincronizações deaios, 44 inseminações artificiais, 9 sondagens gástricas, 10 castrações de leitões, 115 intradermotuberculizações com respetiva leitura, 1 hemoterapia, 9 lavagens prepuciais, além do maneio diário dos animais como brincar, confirmação dos animais carregados em transporte com destino à Argélia, desmame de animais, tratamentos respiratórios e de retenção placentária, entre outros (Tabela 3).

Plano Profilático	1457
Carga de animais no transporte	1035
Palpação retal	150
Intradermotuberculização	115
Ecografia retal para diagnóstico de gestação	115
Desmame de vitelos	100
Sincronização deaios	45
Inseminação Artificial	44
Fluidoterapia em vitelos	38
Exame Andrológico	35
Tratamento Respiratório	35
Colocação de brincos	31
Amostragem de sangue para sanidade e análise	23
Necrópsias	11
Castração de leitões	10
Sondagem Gástrica	9
Lavagem prepucial	9
Partos Distócicos	5
Eutanásia	3
Resolução de retenção placentária	2
Resolução de prolapso vaginal	1
Contenção química com uso de Zarabatana	1
Hemoterapia	1

Tabela 3: Casuística JMPC Lda.

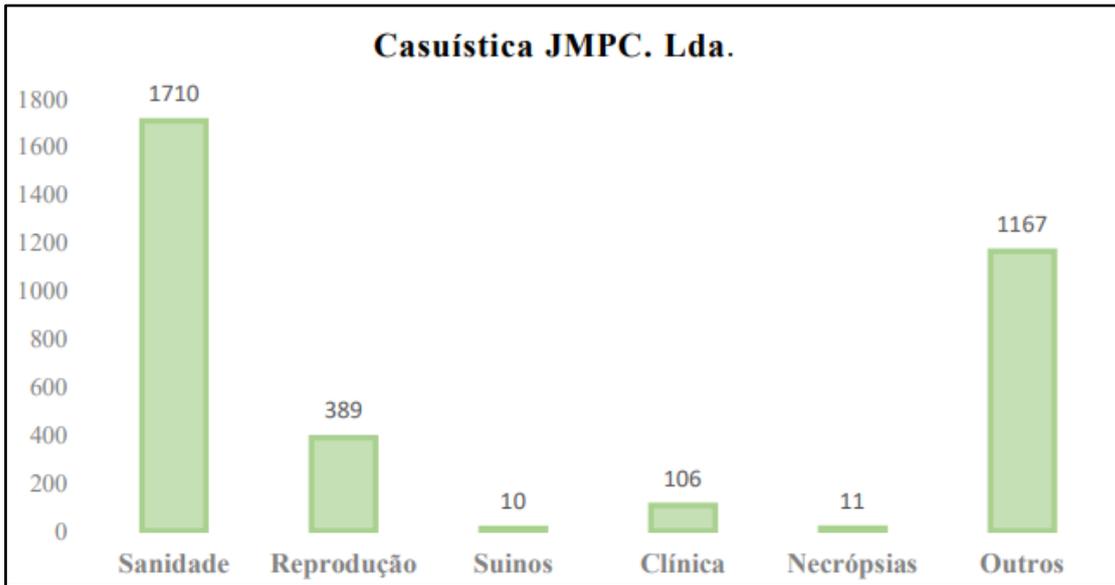


Gráfico 2: Casuística por áreas JMPC. Lda.

II. Introdução

1. Aparelho reprodutor masculino

1.1. Anatomia do aparelho reprodutor masculino

A anatomia do aparelho reprodutor masculino (Figura 1), pode ser dividida, segundo as suas funções, nos componentes de produção, transporte e transferência de espermatozoides, nomeadamente nos testículos, epidídimo e pênis respetivamente (Hopper, 2015).

Na componente de produção, o parênquima testicular contém as células necessárias para a espermatogénese e produção de esteróides. O parênquima está disposto em lóbulos e neles podemos diferenciar três partes, sendo uma delas o tecido intersticial, formado pelas células de Leydig, vasos vasculares e linfáticos que estão dispostos em torno dos túbulos seminíferos. O desenvolvimento tecidual dos túbulos seminíferos aumenta de acordo com o desenvolvimento da circunferência escrotal, tal como número absoluto de células de Leydig e células de Sertoli (Penitente-Filho et al., 2018).

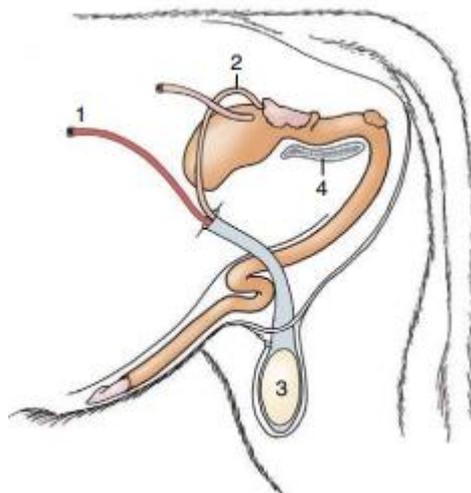


Figura 1: Anatomia aparelho reprodutor masculino de bovino (1: Artéria testicular, 2: Ducto deferente, 3: Testículo, 4: Sínfise pélvica) (Fonte: Adaptada de Dyce et al., 2010)

O outro constituinte do parênquima do túbulo seminífero, é a parede basal, onde se localizam as espermatogónias, células diplóides não diferenciadas que se dividem por mitose e, em seguida os espermatócitos que pela divisão por meiose se vão diferenciar em espermátides que darão origem aos espermatozóides (spz). Nestes túbulos também se encontram as células de Sertoli que vão fornecer a nutrição necessária para as células germinativas em divisão, entre outras funções (Bradley G. Klein, 2020).

Os testículos estão alojados no escroto, o qual está suspenso entre as coxas na região inguinal e é formado pela pele externamente, a túnica subcutânea dartos e a fáscia espermática externa. A camada externa é assim composta pela pele do escroto, túnica dartos, fáscia perineal superficial, fáscia espermática externa e músculo cremáster. A camada interna é por sua vez, composta pela fáscia espermática interna e túnica vaginal parietal (König, 2016). O tamanho dos testículos nos bovinos varia em função da raça, mas normalmente o testículo adulto pesa 300-400 gramas, tem cerca de 10 - 13 cm de comprimento e 5 - 6 cm de largura (Hopper, 2015).

A cobertura do próprio testículo consiste no folheto visceral da túnica vaginal e túnica albugínea, sendo a túnica visceral a mais interna. Existe um espaço virtual entre a túnica vaginal parietal e visceral conhecido como a cavidade vaginal, que se estende para o lado direito e esquerdo, e é dividido por um septo que envolve por sua vez os testículos separadamente e está marcado na zona exterior com um sulco (König, 2016).

O músculo cremáster e a túnica dartos funcionam para regular a proximidade dos testículos da cavidade abdominal e portanto a sua temperatura. Adicionalmente, existem outros mecanismos de regulação da temperatura tais como a presença do saco escrotal fora da cavidade abdominal, presença do plexo pampiniforme e glândulas sudoríparas no escroto. O cordão espermático faz a ligação dos testículos ao corpo e fornece acesso à cavidade abdominal, nomeadamente fazendo ligação com a parte vascular, neural e linfática que suportam os testículos, sendo composto pelo ducto deferente, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos do testículo e epidídimo. Além disso, está adjacente ao músculo cremáster que é o músculo primário que sustenta os testículos e o plexo pampiniforme. Este plexo é uma rede venosa complexa e especializada que envolve a artéria testicular e interfere na termorregulação. No transporte, os espermatozóides vão ser deslocados através dum sistema tubular, que consiste no túbulo seminífero enrolado, túbulo seminífero reto, rete testis, túbulo seminífero eferente, epidídimo e uretra (König, 2016).

A espermatogénese ocorre na parede dentro dos túbulos seminíferos contornados. Esta começa pelo desenvolvimento da espermatogónia que seguidamente evolui para espermatócito primário, espermatíde e finalmente para espermatozóide. Após a conclusão da espermiogénese, os espermatozóides são libertados no lúmen do túbulo seminífero para iniciar o transporte através do túbulo seminífero reto. Este túbulo seminífero reto é simplesmente a ligação entre o tubo seminífero e a rede testicular. A rete testis é uma rede de espaços irregulares e túbulos interconectados que está localizada no interior do testículo e faz ligação entre os tubos

seminíferos e ductos eferentes que ligam o testículo à cabeça do epidídimo (Eurell et al., 2021).

O sistema tubular eferente continua como epidídimo na superfície externa do testículo. O epidídimo é um sistema tubular que permite a maturação e armazenamento dos espermatozoides, produzindo ainda fluido para facilitar o movimento dos mesmos. O epidídimo pode ser diferenciado em duas porções: a parte mais proximal conhecida como cabeça e corpo do epidídimo onde ocorre a maturação de espermatozoides, e porção distal conhecida como cauda do epidídimo onde vão ser armazenados os espermatozoides. Durante a passagem pelo epidídimo, os espermatozoides sofrem alterações morfológicas e funcionais para assim chegarem à cauda do epidídimo para serem armazenados, conservando mobilidade e fertilidade (Eurell et al., 2021).

A transferência dos espermatozoides é alcançada pelo processo de intromissão que requer a ereção do pênis e ejaculação do sêmen. A anatomia pertinente para que esse processo ocorra, inclui o pênis, a musculatura do pênis, os seus vasos sanguíneos e inervação. O pênis pode ser dividido em raiz, corpo e porção livre (onde se localiza o glândula). O tecido que compõe a maior parte do pênis é o corpo cavernoso (Hopper, 2015). Os corpos cavernosos emparelhados originam-se separadamente em cada lado do arco isquiático medialmente à tuberosidade isquiática, e o seu conjunto é conhecido como crus do pênis. Esses crus estendem-se ventromedialmente até à sua união com o corpo esponjoso e a formação do corpo do pênis. O corpo esponjoso é o tecido erétil que envolve a uretra e tem origem no bulbo do pênis. Portanto, a raiz do pênis é formada pelos pilares e pelo bulbo. Caudalmente à raiz do pênis, localizam-se os músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso e retratores do pênis. Durante a ereção os músculos isquiocavernosos vão contrair e dificultar o retorno venoso do espaço cavernoso dos pilares no corpo do pênis. O músculo bulboesponjoso está situado caudalmente ao bulbo do pênis e a sua contração resulta na propulsão do ejaculado pela uretra. O músculo retrator do pênis vai desde as vértebras caudais até a flexura sigmóide distal (König, 2016). O corpo do pênis propriamente dito começa na junção dos dois pilares, distalmente ao arco isquiático, e estende-se cranialmente ao longo da parede ventral do corpo para se tornar a parte livre do pênis no abdômen medio-ventral. O corpo é dobrado em forma de “S”, numa formação conhecida como flexura sigmóide. Na espécie bovina, a glândula do pênis é uma pequena região restrita na extremidade cranial do pênis. A extremidade livre do pênis do touro é torcida no sentido anti-horário, o que se deve à fixação do ligamento apical na extremidade distal do pênis, sendo que este ligamento tem a sua inserção na superfície ventral do arco isquiático (Hopper, 2015).

O prepúcio é composto por uma membrana externa e dobra interna que recobre o corpo e a porção livre do pênis não ereto. A lâmina externa é a dobra externa da pele ligada ao abdómen ventral. A pele com presença de pelos termina no orifício prepucial onde a dobra externa se dobra para dentro para revestir a cavidade prepucial. A lâmina interna serve para fixar a lâmina externa ao epitélio peniano (Dyce et al., 2010).

A irrigação do aparelho reprodutor é composta por várias artérias, sendo que cada órgão tem uma irrigação diferente. Os testículos são irrigados pela artéria testicular, que é um ramo da artéria abdominal e possui este nome quando passa a parede abdominal pelo canal inguinal. À medida que a artéria testicular se vai aproximando do testículo forma uma espiral com o plexo pampiniforme, formando assim o cone vascular do testículo (Hopper, 2015).

A irrigação do pênis é feita através da artéria ilíaca interna. A artéria ilíaca interna é um ramo da artéria aorta, emitido à entrada da cavidade pélvica. Dentro da cavidade pélvica, a artéria ilíaca dá origem à artéria glútea caudal e pudenda interna. A artéria pudenda interna segue como artéria do pênis, que vai irrigar o músculo bulboesponjoso e os espaços cavernosos do corpo esponjoso. A artéria do pênis origina o ramo profundo do pênis que vai irrigar o corpo cavernoso e o tecido erétil do pênis. Após esta ramificação, a artéria do pênis continua-se como artéria dorsal do pênis já que passa na parte dorsal ao longo do pênis e vai até à glândula e o prepúcio (Hopper, 2015).

A inervação da genitália é assegurada pelo nervo pudendo que se divide em vários ramos. Estes são o ramo prepucial, o ramo escrotal e o ramo dorsal do pênis. Estes ramos, juntamente com o nervo pélvico e o nervo hipogástrico, são os encarregados de dar as inervações motoras, sensoriais e parassimpáticas (Hopper, 2015).

As glândulas genitais acessórias do touro incluem as glândulas vesiculares, ampolas do ducto deferente, próstata e glândulas bulbouretrais. Todas elas, com exceção da glândula bulbouretral, drenam o seu conteúdo na uretra através do colículo seminal (Dyce et al., 2010). A glândula bulbouretral drena o seu conteúdo no recesso uretral (Hopper, 2015). As glândulas vesiculares são as de maior tamanho e contribuem com o maior volume para o ejaculado. É uma glândula par, lobada e de consistência firme situada dorsalmente à bexiga e lateral aos ureteres e às ampolas dos ductos deferentes. O corpo da próstata está situado dorsalmente à uretra e caudal às glândulas vesiculares. A parte disseminada está na parede da uretra e coberta pelo músculo uretral. A glândula bulbouretral é bilateral e está situada em cada lado do plano mediano e dorsalmente à uretra (Hopper, 2015).

1.2. Função endócrina

A ação hormonal depende da libertação de hormonas pela glândula endócrina apropriada e o transporte através do sistema circulatório para o tecido alvo onde estas se vão ligar aos recetores celulares e dessa forma induzir uma resposta fisiológica (Hopper, 2015). Em condições fisiológicas, a regulação da função testicular depende das gonadotrofinas, tais como a hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH) e prolactina (Hopper, 2015).

Os bovinos têm uma regulação neuroendócrina das funções reprodutivas, o que quer dizer que o sistema endócrino relevante à reprodução está sob o controlo do sistema nervoso, sendo ainda reguladas sazonalmente (Hopper, 2015). A espécie bovina, é uma espécie não sazonal. No entanto há estudos que observaram animais com alterações hormonais dependentes da estação do ano, nomeadamente na secreção de testosterona em resposta à LH durante o verão (Stumpf et al., 1993). Outros estudos relatam efeitos semelhantes, com afetação de características reprodutivas, incluindo a qualidade do sêmen e concentrações sanguíneas de LH e testosterona (Jiménez-Severiano et al., 2003).

A FSH é uma das hormonas responsáveis pela espermatogénese e pelo processo de produção de hormonas como são, testosterona, progesterona, estrogénio e colesterol (Hopper, 2021).

A LH é responsável pela estimulação e o suporte das células germinativas (Senger, 2005). A ação principal da LH é sobre as células de Leydig, onde vai controlar a síntese de testosterona (Noakes et al., 2008). As células de Leydig contêm recetores onde a LH se liga ativando a enzima Adenil Ciclase para catalizar a síntese de monofosfato de adenosina cíclico que por sua vez, ativa a proteína AMP cíclico-dependente quinase, aumentando a conversão do colesterol em pregnenolona (Senger, 2005).

A testosterona é o principal androgénio que está envolvido na espermatogénese (Walker et al., 2005), sendo necessária para a produção de espermatozóides e sua posterior maturação no epidídimo, uma boa função das glândulas sexuais acessórias e para o desenvolvimento de caracteres masculinos secundários (Noakes et al., 2008).

Quanto à prolactina, é conhecida por potenciar o efeito da LH na espermatogénese e pela regulação da função das células de Leydig. Há uma relação dos animais com deficiências na concentração plasmática de prolactina e redução na fertilidade com atrofia testicular evidente (Hopper, 2015).

2. Exame Andrológico

A avaliação andrológica do touro (EA) evoluiu como um procedimento veterinário de baixo custo que oferece benefícios como a redução do risco de ter um touro infértil e das suas consequências negativas, e ao mesmo tempo ter maior eficiência na utilização dos touros, aumento de fertilidade e economia de recursos. Tem como objetivo identificar touros inférteis e subférteis para que possam ser removidos da população reprodutora. A combinação de exames físicos/reprodutivos e avaliação de sémen pode contribuir para melhorar a fertilidade de vacadas, bem como perceber os fatores que afetam a mesma (Chenoweth et al., 2016).

Atualmente, os vários sistemas de avaliação de touros em todo o mundo incluem um exame físico sistemático que incide sobre as funções reprodutivas e avaliação da motilidade, morfologia dos espermatozoides e concentração da amostra (Beggs et al., 2013).

Diferentes pesquisas em vários regimes de produção e locais indicam que aproximadamente 65- 85% de touros são classificados como “reprodutores potencialmente satisfatórios” quando submetidos a uma avaliação de aptitude reprodutiva. No entanto, essa classificação também dependerá da idade, genética, ambiente, manejo, seleção prévia e critério do operador (Hopper, 2021).

O requisito a que mais importância se dá na avaliação andrológica do touro é, o perímetro escrotal, baseado na idade e na qualidade do sémen (Susilawati et al., 2020).

A avaliação do sémen, tem sido uma componente importante do EA desde 1950, altura em que se começou a conseguir fazer uma colheita de sémen segura em touros não treinados. A concentração de espermatozoides viáveis é considerada um parâmetro fundamental na qualidade do sémen, assim como a motilidade e a morfologia espermática que aumentou a sua importância nos últimos anos (Chenoweth et al., 2016). Tanto a morfologia como a motilidade podem ser sumariamente avaliadas em condições de campo e são utilizadas tecnologias sofisticadas, como análise de espermatozoides assistida por computador (CASA) e microscópio de contraste de interferência diferencial (DIC), para uma análise completa da amostra de sémen (Chenoweth et al., 2016).

Um EA executado corretamente fornece uma avaliação do potencial reprodutivo do touro apenas para a data realizada. Para um touro acasalar com vacas com sucesso, ele deve ser capaz de sobreviver (manter uma boa condição corporal), identificar as fêmeas em cio, conseguir montar a fêmea e depositar sémen fértil no trato reprodutor feminino. Assim, uma avaliação de aptidão reprodutiva deve incluir, um exame físico completo, um exame do trato reprodutivo e a avaliação do sémen. Se um touro não corresponder aos padrões estabelecidos

mas exista a possibilidade de melhorar a sua avaliação, pode ser classificado como "indeterminado". Este touro deve então ser testado novamente, geralmente 60 dias depois da avaliação insatisfatória já que este tempo será o necessário para um novo ciclo completo de espermatogénese. Um touro que por qualquer motivo não cumpra os parâmetros mínimos no EA e cuja melhoria seja improvável, é classificado como "insatisfatório" (Hopper, 2015).

Como em tudo, há certas limitações no EA, sendo a primeira e mais óbvia a não inclusão da avaliação da libido. Outra prende-se com as diferentes perspetivas entre diferentes médicos veterinários, devido a diferenças entre equipamentos ou diferenças no nível de competência ou atenção no procedimento. Finalmente, cada avanço na compreensão da etiologia e/ou efeito real na fertilidade de uma determinada anomalia espermática, tende a levantar novas questões do que podem ser limites aceitáveis para a taxa de anomalias nos espermatozoides (Hopper, 2014).

O objetivo do exame não é diferenciar os níveis de fertilidade, mas sim estabelecer um padrão que separa o indivíduo subfértil do animal fértil e apto para a reprodução. O limiar razoável para a motilidade individual é de 30%, o que reflete uma preocupação já que muitas vezes a motilidade do sémen do touro não pode ser avaliado razoavelmente em condições de campo (Chenoweth, 2002). O limiar morfológico normal é de 70% sem fazer distinção quanto à classificação das formas anormais e o perímetro escrotal, tem que ter como mínimo 31 cm. (Chenoweth et al., 2016).

2.1. Exame estado geral

2.1.1. Estatuto sanitário

Quando um exame andrológico (EA) é realizado com o objetivo de avaliar o potencial de um touro para cobertura natural, a componente física assume um significado primordial (Hopper, 2015). A história do animal pode fornecer ao examinador informação na avaliação do sémen (Ptaszynska et al., 2007).

A transmissão de doenças venéreas como Rinotraqueite Infeciosa Bovina (IBR), Doença Vírica Bovina (BVD), *Campylobacter*, *Tritrichomonas*, entre outras, podem ser a causa de deficiência reprodutiva na vacada e no reprodutor. Estas doenças contagiosas mediante a monta natural ou Inseminação artificial (IA) com sémen infetado, devem ser testadas já que a sua presença nos reprodutores, manifestando sinais clínicos ou não, poderiam diminuir a capacidade reprodutiva devido a que estas doenças em ocasiões poderiam causar lesões que impedissem ao touro realizar a monta ou realizar a monta sem sucesso (BonDurant, 2005).

2.1.2. Aprumos

Os touros dependem dos membros para conseguir realizar a monta e precisam de percorrer alguma distância para chegar à alimentação e água. Assim sendo, a avaliação dos problemas de aprumos e da conformação das extremidades é fundamental no exame de um animal destinado à reprodução (Brogliatti, 2013).

2.1.3. Exame físico

Quanto ao exame físico, deve observar-se o animal à distância para ver o seu comportamento e avaliar a sua marcha, visão e alterações na conformação (Figura 1). Assim que o animal entra na manga deve fazer-se um exame físico geral detalhado, avaliando todos os sistemas do animal, excluindo patologias do aparelho cardiovascular e digestivo (Rangel et al., 2009).



Figura 2: Touro reprodutor raça Limousine (Fonte: Autor)

2.2. Exame órgãos reprodutores

2.2.1. Testículos e epidídimo

No exame do aparelho reprodutor é fundamental a avaliação da integridade do escroto, testículos e cordão espermático, avaliando o tamanho, forma e textura (Ptaszynska et al., 2007).

A palpação dos testículos permite determinar a integridade do parênquima testicular. A cabeça e o corpo do epidídimo também são localizados na palpação quando os testículos são

deslocados dentro da bolsa escrotal, assim como a cauda do epidídimo, já que alterações de tamanho e consistência, são consideradas características patológicas (Brogliatti, 2013).

2.2.2. Perímetro escrotal

O perímetro escrotal (PE) é uma medida facilmente obtida, usada como parâmetro para a seleção de touros de qualidade superior. O potencial reprodutivo do touro é medido através da quantidade e qualidade do sêmen produzido sendo que ambas estão relacionadas com o PE (Wahyudi et al., 2022).

Esta medição pode ser feita através de uma abordagem lateral ou traseira dependendo da preferência do examinador e temperamento do touro (Figura 2). Depois de forçar suavemente os testículos para o fundo do escroto e garantir que a fita métrica está situada na zona de maior diâmetro, a medição pode ser registrada. Se o perímetro escrotal estiver abaixo do mínimo estabelecido, não há necessidade de continuar com o exame. Pode existir uma diferença significativa entre as medidas em touros jovens e touros mais velhos (Hopper, 2014). Lunstra et al. (1978) indica que 32% dos touros com PE de 27 cm, 52% com PE de 28 cm e 74% com PE de 29 cm, já eram púberes e afirma que 97% dos animais observados com PE de 30 cm já tinham chegado à puberdade. As raças avaliadas foram Hereford, Aberdeen-Angus, Red Poll, Brown Swiss, cruzados de Hereford e Aberdeen-Angus. A idade com que os animais atingem 30 cm de PE, determina se estes têm uma puberdade precoce, média ou tardia (Brogliatti, 2013).

Num estudo feito na Austrália, observou-se que touros com medidas escrotais entre 31 e 44 cm eram mais propensos a exibir um espermograma satisfatório ($\geq 70\%$ de espermatozóides normais) (Chenoweth et al., 2016).

Wahyudi et al., (2022) relatou nas espécies de bovinos *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bos sondaicus* que a circunferência escrotal foi significativamente correlacionada com o volume de sêmen, concentração e motilidade dos espermatozóides. Outros autores determinaram que existe na espécie *Bos taurus* uma baixa correlação entre circunferência escrotal e o volume e a motilidade e uma correlação mais elevada entre circunferência escrotal e concentração de espermatozóides e na *Bos indicus* uma correlação quase perfeita (Fonseca et al., 2019).



Figura 3: Medição do PE (Fonte: Autor)

2.2.3. Glândulas genitais acessórias

A genitália reprodutiva interna é avaliada através do exame transretal. Na palpação transretal são identificadas eventuais alterações na uretra pélvica, próstata, vesículas seminais, ampolas dos ductos deferentes e glândulas bulbouretrais (Hopper, 2015).

2.2.4. Pénis

A palpação das ampolas dos ductos deferentes, vai provocar a estimulação e exteriorização do pénis. Este fenómeno pode ser aproveitado para avaliar e palpar a porção livre do pénis e o prepúcio. Durante esta avaliação do pénis, podem ser observadas lesões como verrugas, lacerações, persistência do frénulo ou anéis de pelo (Hopper, 2015) (Figura 3).

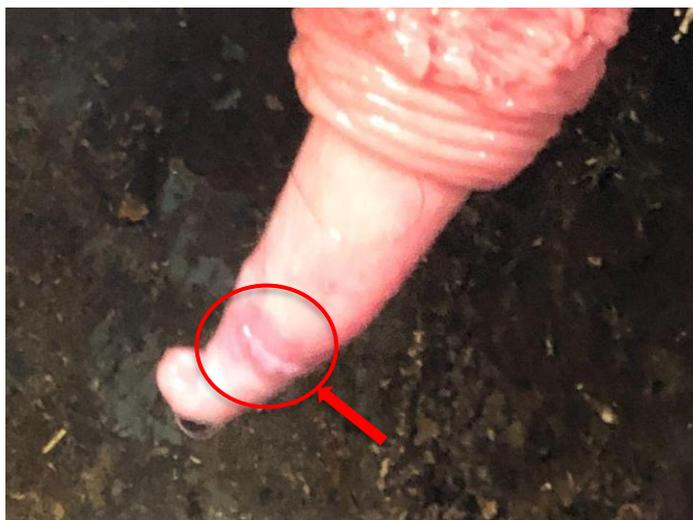


Figura 4: Pénis com laceração (Fonte: Autor)

2.3. Patologias do aparelho reprodutor masculino

O touro deve conseguir identificar a fêmea em estro, aproximar-se, exteriorizar o pénis, montar adequadamente, atingir uma ereção completa, localizar a vulva e conseguir a intromissão, ejacular e desmontar. Os requisitos básicos são óbvios e uma solidez estrutural é necessária para um coito bem sucedido. O coito nos bovinos ocorre em pouco tempo, geralmente menos de 10 segundos para monta e intromissão e 1-2 segundos para a ejaculação. Quando há um aumento exuberante destes tempos, normalmente poderá estar associado a patologias do esqueleto axial ou apendicular ou pode indicar problemas no processo de ereção, impedimento na protusão peniana e extensão ou falta de inervação da glande ou pénis (Barth, 2015).

As patologias no aparelho reprodutor masculino são relativamente comuns e incluem malformações no pénis e alterações nas glândulas genitais acessórias. Estas patologias e a falta de líbido podem ser algumas das razões pelas quais o touro não seja fértil. Muitas destas patologias, algumas delas passando despercebidas, são detetadas na avaliação física do touro, antes da avaliação seminal. Quando se fala da importância de uma boa avaliação prévia é por causa deste tipo de patologias que chegam a ser tão importantes como uma má qualidade do sémen (Barth, 2015).

2.4. Colheita de sémen (técnicas)

Seguido ao exame físico, e verificando que não há problemas a assinalar, pode proceder-se ao seguinte passo, que será o estímulo para a ejaculação para posterior avaliação da amostra seminal (Hopper, 2015).

Existem várias formas de colheita de sémen. Este pode ser coletado de forma manual com a estimulação manual mediante massagem transretal, cuja técnica é pouco usada devido à dificuldade que alguns touros têm de ejacular desta forma e porque a amostra obtida é de fraca qualidade, sendo ainda assim útil em animais jovens ou em animais que não respondem à eletroejaculação (Shukla., 2020). A vagina artificial, é outra das técnicas de colheita de sémen apesar de ser pouco utilizada devido à necessidade de ter sempre uma fêmea disponível e treinada para ser utilizada como manequim. Tem a ventagem de permitir avaliar o líbido do animal já que este estará perante uma fêmea ou um manequim para estimular a ejaculação (Barth et al., 2004).

A técnica mais utilizada nos EA é a eletroejaculação (Figura 4 e 5). Este método é considerado o mais fiável e com o qual se consegue uma amostra de maior qualidade (Barth et al., 2004).



Figura 5: Sonda de eletroejaculador usada em bovinos (em baixo) e materiais usados na avaliação do sémen (Fonte: Autor)

Para obter os melhores resultados na estimulação do animal, é recomendado o uso da sonda de maior tamanho que o animal aceitar, já que se vai adaptar melhor ao espaço transretal

onde vai ser colocada e vai haver um maior contacto com a superfície das glândulas vesiculares e a próstata, para assim os estímulos serem mais eficientes. Geralmente são utilizadas sondas de 50, 75 ou 90 cm, embora existam sondas menores que são usadas em animais de menor tamanho, também com bastante sucesso (Freshman, 2002).

Após a correta lubrificação da sonda, esta pode ser colocada no reto (Figura 6) e dar início a um ciclo programado ou manual (Figura 7) de estimulação com voltagens crescentes de 0,5 em 0,5 vóltios (V) e entre os 100V até aos 240V. O tempo até a ejaculação vai variar em cada touro, dependendo da resposta do animal à intensidade elétrica do estímulo. Uma vez que o touro começa a ejacular, as primeiras emissões são descartadas e só se faz a recolha quando o conteúdo começa a ser menos translúcido. Pode acontecer que o programa termine e não ocorre ejaculação. Neste caso, deve haver um período de descanso de 2-3 minutos e repetição do ciclo de estimulação (Hopper, 2015).



Figura 6: Eletroejaculador e sonda (Fonte: Autor)



Figura 7: Colocação de sonda no reto (Fonte: Autor)

A colheita do sémen é feita para um tubo que pode ser colocado ao mesmo tempo dentro de um outro tubo com água morna (37°C) para diminuir assim o risco de choque térmico dos espermatozoides (Figura 8) (Hopper, 2015). Não usar este método pode ter desvantagem, sobretudo em climas muito frios, já que existe um maior risco de choque térmico e como consequência morte dos espermatozoides (Freshman, 2002).



Figura 8: Recolha de sémen com controlo manual da intensidade de estimulação (Fonte: Autor)



Figura 9: Recolha de sémen (Fonte: Autor)

2.5. Avaliação do sémen

A avaliação de sémen consiste na quantificação da motilidade espermática, concentração espermática e formas anormais (Hopper, 2015).

Uma boa amostra de sémen deve conter um número suficiente de espermatozóides viáveis, morfologicamente normais, potencialmente capazes de atingir o oviduto, fecundar o oócito e desenvolver um embrião viável (Muiño et al., 2005).

Como referem Hidalgo et al., (2005), as características que os espermatozóides com capacidades fecundantes devem ter são motilidade progressiva, morfologia normal, metabolismo energético ativo, capacidade de desenvolver uma motilidade hiperativa, boa integridade estrutural e funcionalidade de membrana, integridade das enzimas associadas com a fecundação, capacidade de penetração e transferência de material genético.

Um ejaculado normal, com espermatozóides normais designa-se de normoespérmico. Quando um ejaculado não é normal, pode tomar várias designações consoante as suas características. Assim, a oligospermia ocorre quando há um volume de ejaculado diminuído com poucos espermatozóides, sendo que a não produção de ejaculado se denomina de aspermia. Quando o ejaculado produzido contém espermatozóides com alterações na motilidade espermáticas, recebe o nome de astenozoospérmico, a ausência de motilidade é referida como alcinozoospermia e a presença de ejaculado sem presença de espermatozóides designa-se de

azoospermia. Dispermia, refere-se a pequenas variações pouco relevantes na normalidade dos espermatozoides. Quando há presença de sangue é designado como hemospermia e necrozoospermia quando há presença de espermatozoides mortos no ejaculado (Sequeira, 2015).

Logo após a colheita, é efetuada uma avaliação subjetiva da concentração mediante a cor, volume de ejaculado e motilidade massal. Estes três parâmetros não têm uma grande relevância para a avaliação da amostra já que não são considerados que tenham uma relação direta com a fertilidade do touro mas que junto com o resto dão uma informação da qualidade da amostra bastante relevante (Freshman, 2002).

2.5.1. Volume

O volume do ejaculado depende de vários fatores, entre eles a raça, idade, o ambiente (Chenoweth & McPherson, 2016), a alimentação e o manejo e ainda o método e a frequência da recolha (Sieme, 2009). No entanto, é geralmente aceite que possa variar entre os 2-10 mililitros (mL) de volume de ejaculado (Chenoweth et al., 2016).

2.5.2. Cor

A cor, apesar de ser avaliada de forma subjetiva, está relacionada com a densidade do ejaculado, ou seja, com a concentração de espermatozoides (Tabela 4). A concentração esperada para um ejaculado de touro está entre os 300-600 x 10⁶ (Chenoweth et al, 2016). (Figura 9)

Translúcido	< 200 milhões/ml de spz
Branco aquoso	250-400 milhões/ml de spz
Branco leitoso	400-750 milhões/ml de spz
Branco cremoso	> 750 milhões/ml de spz

Tabela 4: Classificação por cor da amostra seminal (Adaptada de Kanchan et al., 2015).

O ejaculado pode apresentar alguma cor que não seja a esperada devido à contaminação com alguma substância como urina, sague ou pus. O ejaculado pode apresentar uma cor amarelada quando há presença de pus ou urina (Figura 10), vermelho ou rosado quando apresenta algum grau de conteúdo de sangue fresco e uma cor castanha pode estar relacionada

com sangue seco. Também se pode observar uma cor amarelo-esverdeado, sendo esta indicadora da presença de *Pseudomona aeruginosa* ou então, tratar-se de um animal tratado recentemente com vitamina- B12 (Chenoweth et al., 2016).



Figura 10: Diferentes ejaculados (Fonte: Autor) **Figura 11:** Ejaculado com urina (Fonte: Autor)

2.5.3. Concentração

A concentração da amostra representa o número de espermatozóides por unidade de volume (Figura 11 e 12) (Chenoweth et al., 2016). Tradicionalmente é determinada por meio de câmaras de contagem de células (Câmara de Neubauer), sendo este considerado o melhor método de avaliação da concentração espermática.

A espectrofotometria também é um método rápido e fácil para a medição da concentração espermática. Os resultados são baseados na absorção ou dispersão da luz provocada pelos espermatozoides em suspensão (Rangel Porta et al., 2009). Outra possibilidade de medição da concentração de espermatozóides na amostra de ejaculado, é mediante uma análise assistida por computador (CASA), que consegue determinar a concentração e motilidade espermática simultaneamente e com precisão adequada (Maree, 2021).



Figura 12: Espermatozoides ao microscópio x1000 com boa concentração (Fonte: Autor)

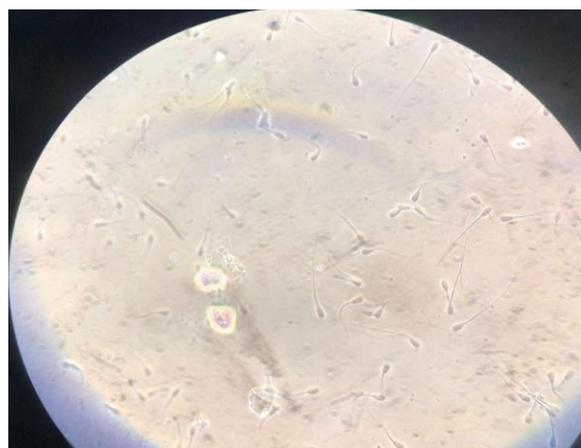


Figura 13: Espermatozoides ao microscópio x1000 com pouca concentração (Fonte: Autor)

2.5.4. Motilidade

Dentro da motilidade são avaliados dois parâmetros: motilidade massal e motilidade individual. A motilidade massal é a capacidade de movimento dos espermatozoides em grupo no ejaculado. Esta medição é feita com o ejaculado não diluído e o movimento em massa depende de três fatores: concentração espermática, percentagem de espermatozoides com progressão linear e a velocidade da progressão dos espermatozoides. A classificação da motilidade massal é feita numa escala de 0 a 5, onde 5 indica a presença de ondas com movimentos rápidos e vigorosos e 0 indica a ausência de movimentos em ondas (Tabela 5) (Muiño et al., 2005).

0	Sem ondas de movimento
1	Ligeira ondulação ou vibração, sem progressão
2	Progressão lenta, com paragens
3	Movimento progressivo contínuo e velocidade moderada
4	Movimento progressivo, rápido
5	Movimento progressivo com ondas muito rápidas

Tabela 5: Classificação motilidade massal (Adaptada de Catena et al., 1999)

A motilidade individual é avaliada ao microscópio com uma ampliação de 400x. Quando a amostra é muito densa deve ser diluída com um diluente estéril para permitir uma observação adequada dos espermatozóides individualmente (Tabela 6) (Chenoweth, 2002).

Muito bom	> 80% de motilidade progressiva (MP)
Bom	60-79% de MP
Mediocre	40-59% de MP
Má	< 40% de MP

Tabela 6: Classificação motilidade individual (Adaptada de Ribeiro-Peres et al., (2014)

2.6. Morfologia dos espermatozóides

A análise morfológica dos espermatozóides é uma componente fundamental na avaliação seminal do touro (Fernández et al., 2021). Dentro das formas anormais que um espermatozóide pode apresentar, é feita uma distinção entre anomalias de cabeça, anomalias da parte intermédia e anomalias da cauda. Também são classificadas como anomalias primárias ou secundárias, segundo o órgão onde é provocada essa anomalia (Hidalgo et al., 2005) ou terciárias que são anomalias causadas pela técnica (Izquierdo et al., 2016).

A morfologia é avaliada pela observação de uma gota diluída e corada com Eosina-Nigrosina (Figura 13) observada ao microscópio com ampliação de 1000x (Crespo et al., 2014). Devem ser observados pelo menos 100 espermatozóides com atenção para conseguir ter uma boa avaliação morfológica (Toribio, 2015). A coloração Eosina-Nigrosina permite determinar a morfologia e vitalidade dos espermatozóides através de um corante ácido que consegue penetrar na cabeça do espermatozóide corando-o de vermelho no caso de este se encontrar com lesões na membrana celular ou mesmo morto. Espermatozóides com a membrana celular integra aparecem como brancos (Hopper, 2015).

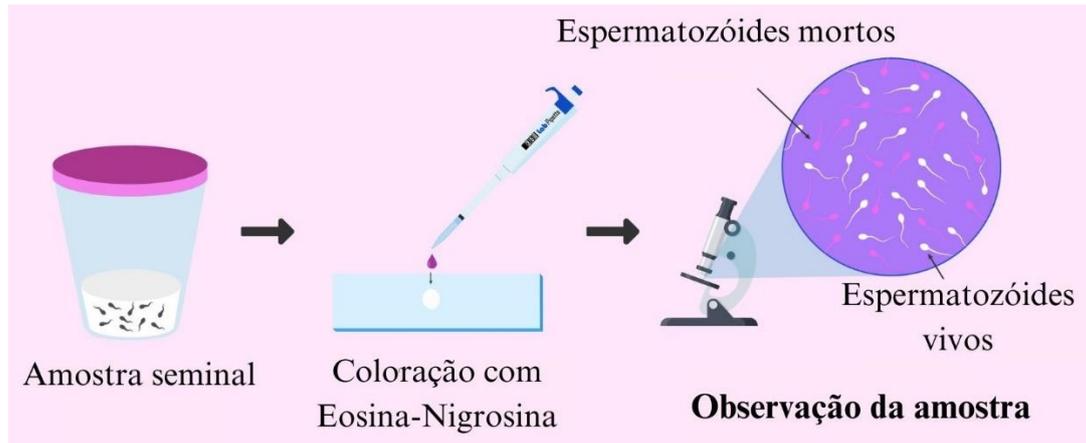


Figura 14: Coloração com Eosina-Nigrosina (Adaptado de Martinez et al., 2020)

2.7. Anatomia do espermatozóide

O espermatozóide normal é composto por uma cabeça e uma cauda. A cabeça está cheia de cromatina, onde se encontra o material genético do espermatozóide. No caso dos bovinos a cabeça do espermatozóide varia entre 8 e 10 μm de comprimento, 4 e 4,5 μm de largura e 1 e 1,5 μm de altura. A cauda tem aproximadamente 40-45 μm de comprimento e divide-se em pescoço, peça intermédia, peça principal e peça final (Hopper, 2015) (Figura 14).

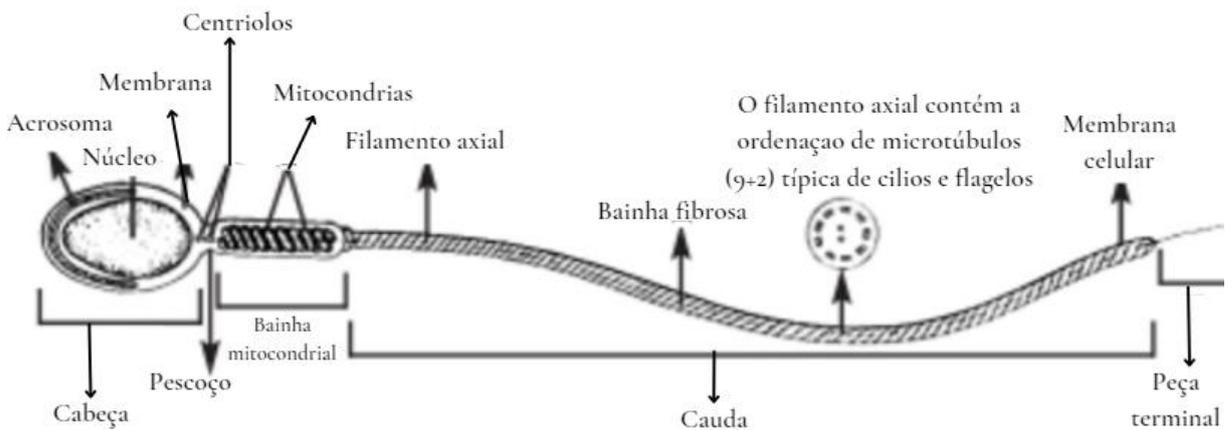


Figura 15: Partes do espermatozóide (Adaptado de Hidalgo et al., 2005)

2.8. Formas anormais

A presença de formas anormais na análise do ejaculado é bastante comum, sendo que algumas destas formas anormais podem causar infertilidade e algumas podem ser hereditárias. Há formas anormais que não permitem o desenvolvimento do movimento normal do espermatozóide e por isso, estes não conseguem progredir até ao gameta feminino. Estas estão normalmente situadas na cauda do espermatozóide ou podem ser anomalias da peça intermédia ou cabeças destacadas. Outros espermatozoides com forma anormal conseguem fecundar mas sempre com um desenvolvimento da gestação defeituosa (Chenoweth, 2002).

As formas anormais primárias ocorrem durante a espermatogénese, enquanto que as formas anormais secundárias ocorrem no epidídimo. Dentro das formas anormais primárias, encontram-se: espermatozoides subdesenvolvidos, cabeças e caudas duplas, cabeças piriformes, cabeças anormais pequenas, cabeças anormais livres, contornos anormais, gotas citoplasmáticas proximais, defeitos do acrossoma, caudas enroladas e caudas acessórias (Figura 15). Dentro das formas anormais secundárias, encontram-se: cabeças normais pequenas, cabeças gigantes e curtas, membranas acrossomais destacadas, dobradas ou soltas, implantação abaxial da cauda do espermatozóide, gotas citoplasmáticas distais, caudas dobradas e caudas enroladas distalmente (Figura 16) (Hopper, 2015). Outra das classificações que Barth et al., (2004) fez das formas anormais dos espermatozoides, é segundo a importância das formas anormais sobre a função. Quando as formas anormais presentes na amostra seminal não interferem na qualidade final do ejaculado, classificam-se como "Menores" e quando pelo contrário, a quantidade de formas anormais, interfere negativamente na qualidade seminal, classificam-se como "Majores".

A percentagem máxima recomendada de formas anormais é de 30% (Chenoweth, 2002).



Figura 16: Formas anormais primárias. A: spz normal, B: Defeito de gota distal, C: Defeito de cauda dobrada, D: Defeito tipo “Dag” (Hopper, 2014)

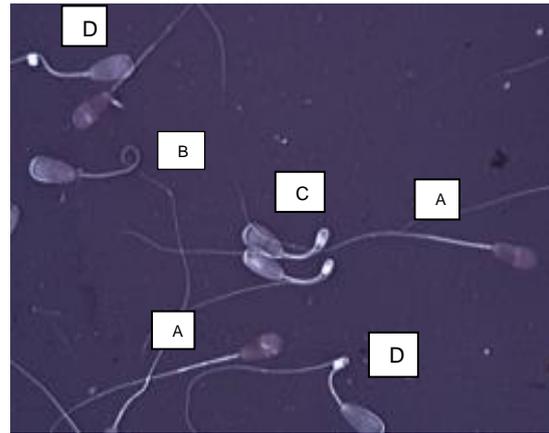


Figura 17: Formas anormais secundárias. A: Spz normal, B: Cauda enrolada, C: Gota citoplasmática distal, D: Gota citoplasmática intermedia (Adaptada de Hopper, 2015)

III. Objetivos

O trabalho prático que se apresenta em seguida tem como objetivo verificar a eficácia e praticidade do equipamento automatizado iSperm em exames andrológicos feitos em condições de campo e ainda confirmar a correlação que existe entre o perímetro escrotal do touro (uma medida usada tradicionalmente no EA) e a qualidade do sémen observada pelo sistema automatizado. Dentro da qualidade do sémen são considerados vários parâmetros, tais como concentração de spzs, mobilidade massal, percentagem de formas anormais e cor da amostra do ejaculado.

IV. Materiais e métodos

O estudo apresentado foi realizado com os dados obtidos na realização de exames andrológicos, mediante um prévio exame físico do animal, eletroejaculação com programa automático, e uma posterior análise do sémen com o equipamento iSperm (Figura 18). O equipamento iSperm é um tablet mini assistido com computador (CASA) que permite a análise e a recolha de vídeos e imagens da amostra seminal recolhida. Este equipamento analisa a qualidade de sémen de várias espécies e oferece um serviço onde o operador consegue realizar uma análise de sémen a campo de maneira rápida e sofisticada (Dini et al., 2019).



Figura 18: Equipamento iSperm (Fonte: Autor)

Foram realizados 96 exames andrológicos a um total de 91 animais, 5 dos animais com 2 avaliações. Os exames foram realizados durante as épocas reprodutivas 2019/20 20/21 e 21/22, nos meses compreendidos entre Outubro e Junho (ambos incluídos). Os exames andrológicos foram realizados em diferentes explorações do Alentejo e sempre realizados pelo mesmo operador. As raças observadas no estudo foram Limousine (n=53), Aberdeen-Angus (n=18), Salers (n=3), Preta (n=2), Blonde d'Aquitaine (n=2), Charolês (n=1) e os seus cruzamentos (n=12), tendo estes animais idades compreendidas entre os 16 meses e os 10 anos de idade. Devido ao pequeno número de indivíduos, as raças Salers, Preta, Blonde d'Aquitaine e Charolês foram analisadas como um só grupo denominado "Outras". Todos os animais se encontravam em regime de pastagem extensiva e nenhum deles estava em contato com vacas no momento da realização do exame. Não foi utilizada sedação para a realização dos exames.

Os dados recolhidos durante o exame foram:

- Idade
- Raça
- Condição corporal
- Perímetro escrotal

- Volume de ejaculado
- Cor de ejaculado
- Viscosidade
- Concentração de spzs
- Mobilidade massal
- Mobilidade progressiva
- % de Formas anormais

Os dados foram recolhidos e colocados em Excel e posteriormente avaliados no programa SPSS, v.25 aplicando os testes de ANOVA para comparações entre épocas reprodutivas, estações do ano, e raças; testes-t para comparação entre animais aprovados e reprovados no exame andrológico e testes de correlação Pearson para avaliar a relação entre as variáveis quantitativas. Os resultados foram considerados como significativos quando $p < 0,05$.

V. Resultados

5.1. Exame do físico do touro e aparelho reprodutor

Nos animais analisados neste estudo, verificou-se que o PE varia consoante a raça considerada ($p < 0,0001$) (Tabela 7 e Gráfico3). Assim, a raça Aberdeen-Angus teve o maior valor de PE (40,79 cm) e a touros com raça cruzada tiveram o menor valor médio (35,21 cm). A relação da raça com outros parâmetros como volume, concentração, mobilidade massal, mobilidade progressiva e formas anormais também foi investigada, mas nenhuma delas foi significativa.

Raça	Perímetro escrotal (cm) (Média ± s.e.m.)	Idade (anos) (Média± s.e.m.)
Limousine	37,64 ± 2,9509	3,616 ± 2,33
Aberdeen-Angus	40,79 ± 3,2758	4,292 ± 2,06
Cruzado	35,21 ± 3,7247	2,643 ± 0,84
Outras	38,25 ± 3,1960	5,944 ± 0,93

Tabela 7: Perímetro escrotal e idade média das raças estudadas

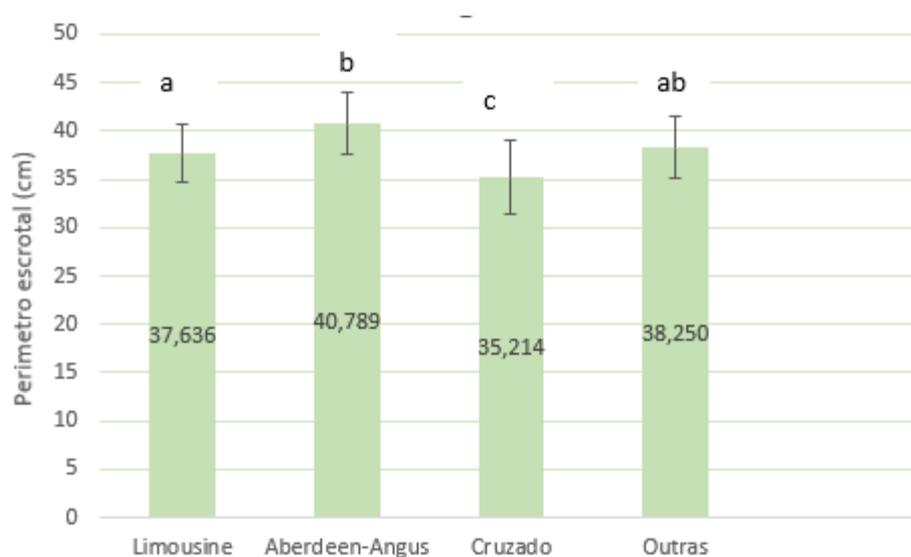


Gráfico 3: Perímetro escrotal das raças

A existência da relação entre a época reprodutiva (19/20, 20/21 e 21/22) e parâmetros como PE, concentração, mobilidade massal, mobilidade progressiva e formas anormais, foi investigada mas não se encontraram relações significativas. A relação entre a época reprodutiva e o volume do ejaculado foi significativa ($p < 0,0001$), no entanto não se fizeram análises subsequentes, pois esta variação de volume pode ser explicada por variações na técnica.

Não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre os parâmetros avaliados e a estação do ano (outono, inverno, primavera e verão).

Verificou-se a existência de uma correlação positiva significativa entre a CC e o PE ($p < 0,05$), sendo esta positiva fraca ($r = 0,232$).

5.2. Avaliação do Sêmen

Foi investigada a existência de correlações entre os parâmetros quantitativos avaliados no estudo, nomeadamente o volume do ejaculado, a concentração de espermatozóides, a condição corporal do touro, o perímetro escrotal, a mobilidade massal e progressiva, a percentagem de formas anormais dos espermatozóides e a idade do touro. Observou-se uma correlação positiva ($p < 0,0001$) da idade com o PE ($r = 0,396$) e com a percentagem de formas anormais ($r = 0,304$), ambas com correlações positivas médias a fracas.

O volume do ejaculado é outro dos parâmetros avaliados e neste estudo observou-se uma correlação negativa ($p < 0,0001$) deste com a mobilidade massal ($r = 0,275$) e a mobilidade progressiva ($r = 0,258$).

Quanto à relação entre a percentagem de formas anormais e a mobilidade massal, e desta com a mobilidade progressiva, verificou-se que ambas eram significativas ($p < 0,0001$) e apresentaram uma correlação negativa ($r = -0,4$ e $r = -0,536$ respetivamente). Ou seja, ejaculados com mais formas anormais apresentavam uma menor mobilidade massal e mobilidade progressiva.

Também as mobilidades massal e progressiva apresentaram uma correlação positiva ($p < 0,0001$) muito forte entre elas ($r = 0,954$).

Em relação às formas anormais, puderam observar-se vários tipos nos exames andrológicos realizados durante o estudo. A maioria dos animais apresentava alguma percentagem de formas anormais, podendo esta ser ou não uma quantidade prejudicial para a qualidade da amostra. Sete animais não apresentaram formas anormais no exame andrológico, sessenta e dois animais apresentaram entre 1-15 % de formas anormais, dezessete animais apresentaram percentagem de formas anormais entre 16 e 24% e onze animais apresentaram mais do que 25% de formas anormais (Gráfico 4). O limite de percentagem de FA para rejeição dos animais foi $> 25\%$ de FA.

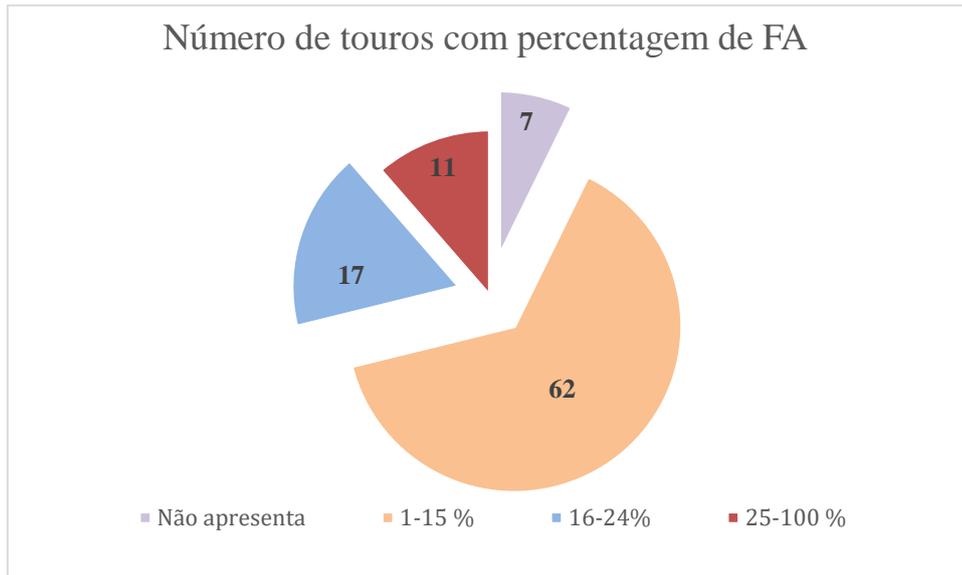


Gráfico 4: Número de touros com percentagem de formas anormais

As formas anormais observadas durante os exames andrológicos foram cabeças destacadas (Figura 17), caudas dobradas, caudas enroladas (Figura 18), caudas curtas (Figura 19), caudas sem cabeça, caudas duplas, gotas citoplasmáticas proximais, gotas citoplasmáticas distais, cabeças piriformes (Figura 20) e caudas em “U” (Figura 20).



Figura 19: Cabeças destacadas (Fonte: Autor)



Figura 20: Cauda enrolada (Fonte: Autor)



Figura 21: Cauda curta (Fonte: Autor)



Figura 22: Cabeça piriforme e cauda em “U” (Fonte autor)

5. 3. Avaliação global da aptidão reprodutiva dos animais

Neste estudo foram realizadas 96 avaliações seminais das quais 75 animais foram aprovados e os 21 animais restantes foram reprovados como reprodutores. No teste de amostras independentes entre os touros aptos e não aptos para ser reprodutores verificou-se que touros não aptos tinham significativamente um menor volume de ejaculado e menor mobilidade massal e progressiva e uma percentagem significativamente maior de formas anormais. De fato, verificou-se que os motivos de rejeição foram em consequência de uma má análise seminal, nomeadamente do fato de as amostras seminais não atingirem os valores necessários na mobilidade massal, mobilidade progressiva e/ou apresentarem um número elevado de formas anormais. Nenhum dos animais reprovou por apresentar um PE inferior aos parâmetros estipulados, nem por um mau exame de estado geral ou lesões no aparelho reprodutor.

VI. Discussão

Neste estudo avaliaram-se dados obtidos de exames andrológicos de touros em várias explorações no Alentejo durante três épocas reprodutivas (19/20, 20/21 e 21/22).

As amostras foram avaliadas com o equipamento e sistema CASA iSperm, que proporcionou rapidez, eficiência e portabilidade dos resultados. Dado a escassez de estudos sobre a eficácia deste equipamento a campo, fez-se uma comparação entre leituras feitas com métodos tradicionais (como perímetro escrotal – PE) e as medidas sobre o ejaculado obtidas pelo iSperm. Bulkeley et al., (2021) investigaram a precisão de avaliação do iSperm na espécie canina comparando com o sistema CASA convencional e determinaram que o equipamento oferece um serviço alternativo e bastante preciso mas com alguma variabilidade no coeficiente de variabilidade na avaliação da concentração de espermatozóides. Em equinos a utilização deste equipamento também foi investigada a campo, tendo sido demonstrada a eficácia e praticidade que o equipamento proporciona na análise de sémen (congelado frasco e refrigerado), assim como a rapidez na análise da amostra (Dini et al., 2019). Em bovinos, o equipamento iSperm foi comparado com outro tipo de equipamentos por Silva et al., (2022), tendo os dados sido recolhidos em bovinos mediante eletroejaculação e posterior avaliação com os dois equipamento mencionados. Os resultados desse estudo voltam a confirmar os estudos mencionados anteriormente, de que o equipamento iSperm é um equipamento válido para a avaliação rápida e eficaz de uma amostra de sémen, sendo que de uma pequena quantidade de ejaculado se consegue obter uma avaliação completa e rápida da amostra de uma maneira rápida, mesmo em contexto de campo e no mesmo momento da recolha.

Os resultados obtidos dos exames andrológicos no presente trabalho não mostraram diferenças significativas entre os dados dos diferentes anos (19/20, 20/21 e 21/22), apesar destes anos terem apresentado em Portugal, especialmente no Alentejo, condições diferentes na variedade de disponibilidade de alimentação, qualidade do alimento, mudanças climáticas e ambientais, que poderiam ter tido alguma influência posterior na qualidade seminal. Como neste estudo não foram detetadas diferenças, podemos considerar que estes touros tiveram um maneio semelhante, tendo sido resguardados por um bom maneio de deficiências na alimentação que poderiam promover uma descida na qualidade reprodutiva dos animais (Hafla et al., 2012).

A relação que existe entre a estação do ano e os parâmetros avaliados no sémen não foi significativa no estudo. Estes resultados contrastam com os obtidos por Durba et al., (2008)

que, através do estudo de ejaculados obtidos por eletroejaculação relata que existe uma influência da época do ano sobre as características do ejaculado, tendo observado ejaculados com maior volume nos períodos entre março e agosto. No caso do presente estudo, não pudemos comprovar esta observação, visto a quantidade de ejaculado obtido ter sido apenas a suficiente para se poder fazer uma análise, não tendo levado o ciclo de estimulação até ao final. Como não existe uma sazonalidade marcada nos touros não deveria haver uma variação entre as diferentes épocas reprodutivas e as respetivas estações do ano mas há autores que relatam variações entre as diferentes estações, pondo assim em causa a não sazonalidade da espécie (Snoj et al., 2013).

A relação que existe no presente estudo entre o volume e a época reprodutivas não seria um resultado objetivo já que o volume é um parâmetro que não é avaliado sempre da mesma maneira e cada operador em cada procedimento pode considerar suficiente para uma correta avaliação seminal, volumes diferentes. Foi por este motivo que não se fizeram análises subsequentes envolvendo o volume das amostras e os restantes parâmetros da análise seminal. Mesmo assim, autores como Wahyudi et al., (2022), relacionam positivamente o volume de ejaculado com a qualidade do sémen e Torrado et al., (2016) relaciona uma maior quantidade de volume de ejaculado com uma pior qualidade seminal e com isto maior presença de FA, tendo ambas as investigações utilizando o método de eletroejaculação.

Os resultados deste estudo mostram uma diferença significativa entre o PE das diferentes raças avaliadas, à semelhança de Espitia et al., (2006), que determina a existência de diferenças no PE entre as raças Holstein Frisian x Cebú, Cebú e Romosinuano.

Neste estudo verificou-se ainda uma correlação significativa entre a idade com o PE e com as FA. Esta correlação foi positiva, isto quer dizer que animais com maior idade, vão ter subsequentemente, um PE maior e ao mesmo tempo animais com maior idade, têm ejaculados com mais formas anormais. No entanto, o facto de ser uma correlação baixa, indica que animais com maior idade poderão não ter uma quantidade de formas anormais prejudiciais para a fertilidade do touro. Coulter et al., (1976), relacionaram o PE com a idade em touros em animais com mais de 60 meses e identificaram também uma correlação positiva significativa de $r = 0,59$ ($p < 0,01$). Fonseca et al., (2019), concluíram em raça Nelore que a idade influencia o PE e com o avançar da idade além do aumento do PE, há um aumento da MM e da MP. Espitia et al., (2006), também determina que existe uma correlação positiva significativa entre a idade e o

tamanho do PE ($r = 0,8$). Escolher animais com mais idade poderia ser uma mais valia para ter a certeza que se conseguem ter reprodutores na vacada com as melhores características seminais. No entanto esta escolha não pode ser apenas tomada tendo em conta estes parâmetros, já que a idade elevada também será um fator para a diminuição de outras características do ejaculado. Bhakat et al., (2011) investigou as características do ejaculado na raça Sahiwal e determinou que tanto o volume como as características do ejaculado (mobilidade massal, mobilidade progressiva e concentração de espermatozóides), aumentam até os cinco anos e começam a diminuir a partir dessa idade.

A correlação entre a mobilidade massal e a mobilidade progressiva é bastante óbvia e intuitiva, sendo também este o caso para a correlação encontrada entre estes dois parâmetros e a percentagem de formas anormais. Esta é uma correlação negativa forte, sendo que, quanto menor for a mobilidade massal e a mobilidade progressiva, maior será a percentagem de formas anormais e vice-versa. Tal poderá dever-se ao fato de muitas formas anormais impedirem a mobilidade e/ou a progressão linear dos espermatozóides (Ghirardosi et al., 2018). A insuficiência da qualidade seminal no que concerne estes parâmetros é a principal causa de rejeição observada neste estudo à semelhança do que foi descrito por Barth, et al., (2002).

A correlação observada entre a CC e o PE era já esperada visto que um dos componentes que se pode encontrar entre os invólucros testiculares é tecido adiposo (Kastelic, 2014). Assim, animais com maior CC normalmente apresentam maior quantidade de gordura peritesticular e por isso maior PE. Agliano et al., (2008) determinaram na raça Aberdeen-Angus uma correlação de moderada ($r = 0,69$) a muito alta ($r = 0,94$) entre os parâmetros de peso vivo, condição corporal e PE.

Na meta-análise de Wahyudi et al., (2022), confirma-se que o PE é um parâmetro a ter em conta na classificação dos reprodutores e que está relacionado positivamente com a produção de sémen. Este estudo verifica os resultados obtidos na investigação referida.

Uma das limitações deste estudo é que não foi estudada a viabilidade celular de cada amostra seminal, o que poderia ser relevante para identificar touros com baixa mobilidade espermática devido a morte dos espermatozóides por erro de técnica, como poderia ser uma morte dos espermatozóides por choque térmico e não devido a anomalias primárias ou secundárias dos mesmos (Banaszewska et al., 2015). A avaliação desta coloração seria também uma mais valia como o padrão para se poder comparar a utilização do equipamento iSperm com

as técnicas tradicionais mais morosas e menos práticas, contribuindo assim para o conjunto de estudos já existentes que asseguram a sua eficácia em condições de campo para a espécie bovina (Silva et al., 2022).

No presente estudo foram realizadas 96 avaliações seminais, das quais 75 animais foram aprovados como reprodutores, tendo os 21 animais restantes sido reprovados. Todos os animais foram reprovados devido a insuficientes valores na mobilidade massal e mobilidade progressiva e por apresentar um número elevado de formas anormais. Todos eles apresentaram um PE dentro dos valores estabelecidos, juntamente com um resultado positivo para o resto dos parâmetros avaliados. Assim, poderíamos afirmar que parâmetros como idade, CC e PE não são parâmetros que por si só fariam aprovar um animal. No teste de amostras independentes verificou-se que touros considerados como reprodutores não aptos diferiam significativamente dos touros aptos nos parâmetros de volume, mobilidade massal, mobilidade progressiva e formas anormais. Com respeito ao volume, como falado anteriormente, esta diferença não foi considerada relevante já que pode ser diferente para os diferentes técnicos que realizam o exame por isso este resultado não é considerado. No entanto, mobilidade massal, mobilidade progressiva e formas anormais são parâmetros relevantes, tendo sido suficientes para reprovar os 21 animais não aptos detetados pelos exames realizados. Devido a elevada correlação que existe entre a mobilidade massal e a mobilidade progressiva com as formas anormais era de esperar que variações na mobilidade massal e mobilidade progressiva iriam apresentar variações nas formas anormais. A decisão de não aprovar estes animais baseou-se no fato de a mobilidade e a existência de espermatozóides normais ser fundamental para garantir que se estes touros possam promover gestações nas vacadas onde são inseridos e assim contribuir para a manutenção da viabilidade económica da exploração (Barth, 2018).

VII. Conclusão

O iSperm é um equipamento eficaz sendo capaz de avaliações rápidas de sémen em condições de campo e sem a utilização de instrumento pesados e mais complexos. Este equipamento já foi avaliado para outras espécies onde demonstrou eficácia na avaliação rápida e sofisticado ejaculado, tem apesar disso a limitação da não quantificação da viabilidade celular.

Para a utilização a campo em exames andrológicos em bovinos, este equipamento é ligeiro e fácil de transportar, e principalmente, consegue detetar situações que poderão causar perdas económicas na exploração, avaliando os parâmetros necessários que permitam rejeitar ou aceitar um touro como reprodutor da vacada. É importante ressaltar que, apesar das características do equipamento, não deixa de ser essencial continuar a olhar para o touro e avaliá-lo fisicamente (CC, aprumos, visão, lesões), fazer a medição do PE e a palpação retal para a avaliação das glândulas anexas já que essa parte também é uma parte fundamental no exame andrológico e nem sempre se reflete na qualidade do ejaculado em si.

Por tanto, por meio deste estudo foi possível concluir que o iSperm é um equipamento eficaz na avaliação do sémen porque através dele conseguimos detetar animais subfêrteis e podemos determinar que os parâmetros que avalia são os suficientes para saber se o ejaculado é de boa qualidade ou não, não sendo no entanto a única componente de avaliação no exame andrológico a campo.

VIII. Bibliografía

- A. Ribeiro-Peres, L. Munita-Barbosa, & M. Yumi-Kanazawa. (2014). Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods. *Archivos de Medicina Veterinaria. Valdivia: Univ Austral Chile, Fac Ciencias Veterinarias*, 46, 31–48.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Agliano, Campero, S., Cm, Mezzadra, Fernández, C., Sciotti, M., & Cantón, A. (2008). Evaluation of corporal, pelvic and testicular development in Aberdeen Angus bulls in two beef herds establishments. *Veterinaria Argentina*, 25, 342–363.
https://www.academia.edu/download/42171485/Evaluation_of_corporal_pelvic_and_testic20160205-23199-3a1fn5.pdf
- Albert Barth. (2015). The pathogenesis of abnormal sperm production in bulls. *Western College of Veterinary Medicine, Saskatoon, SK.*
- Alvaro Martinez Moro, Andrea Rodrigo, Marta Barraquero Gomez, & Dr. Sergio Rogel Cayetano. (2020). *Prueba hipoosmótica para el estudio de la vitalidad espermática*. Reproducción Asistida ORG.
- Banaszewska, D., Andraszek, K., Czubaszek, M., & Biesiada-Drzazga, B. (2015). The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. *Animal Reproduction Science*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.019>
- Barth, A.D. (2018). Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12, 158–164.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118000538>
- Barth, Albert D., Arteaga, A. A., Brito, L. F. C., & Palmer, C. W. (2004). Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: An alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Animal Reproduction Science*, 84(3–4), 315–325.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.02.010>
- Barth Albert D, & Waldner Cheryl L. (2002). Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary

- Medicine. *The Canadian Veterinary Journal* , 43(4), 274–284.
- Beggs, D. S., Bertram, J. D., Chenoweth, P. J., Entwistle, K. W., Fordyce, G., Johnston, H., Johnston, P., McGowan, M. R., Niethé, G., Norman, S., Perry, V. E. A., Entwistle K. W., E., Bertram, J. D., Chenoweth, P. J., Entwistle, K. W., Fordyce, G., Johnston, H., Johnston, P., McGowan, M. R., ... Entwistle K. W., E. (2013). Veterinary bull breeding soundness evaluation. In D. S. Beggs (Ed.), *Australian Cattle Veterinarians (ACV)*. Australian Veterinary Association.
- Bhakat, M., Mohanty, T. K., Raina, V. S., Gupta, A. K., Khan, H. M., Mahapatra, R. K., & Sarkar, M. (2011). Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls. *Tropical Animal Health and Production*, 43(6).
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9817-1>
- BonDurant, R. H. (2005). Venereal Diseases of Cattle: Natural History, Diagnosis, and the Role of Vaccines in their Control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21(2). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.03.002>
- Bradley G. Klein. (2020). *Cunningham's. Fisiología veterinaria: Vol. April 27* (ELVESIER (ed.); 6th Edition).
- Brogliatti, G. M. (2013). EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA DEL TORO Y SU IMPACTO DE CALIDAD SEMINAL. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 120–124.
- Bulkeley, E., Collins, C., Foutouhi, A., Gonzales, K., Power, H., & Meyers, S. (2021). Assessment of an iPad-based sperm motility analyzer for determination of canine sperm motility. *Translational Animal Science*, 5(2).
<https://doi.org/10.1093/tas/txab066>
- Carlos Olegard Hidalgo Ordoñez, Carolina Tamargo Miguel, & Carmen Diez Monforte. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecnología Agroalimentaria*, 2, 39–43.
- Catena, M., & J. Cabodevila. (1999). EVALUACIÓN DE SEMEN BOVINO CONGELADO. In *Taurus* (pp. 18–31).
- Chenoweth, P. (2002, September). SEMEN QUALITY ASSESSMENT. *Proceedings, The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop*, 5–6.
- Chenoweth, P. J., & McPherson, F. J. (2016). Bull breeding soundness, semen

- evaluation and cattle productivity. *Animal Reproduction Science*, 169, 32–36.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.03.001>
- Coulter, G. H., & Foote, R. H. (1976). Relationship of Testicular Weight to Age and Scrotal Circumference of Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science*, 59(4), 730–732. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84265-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84265-8)
- Crespo, Edward, & Quintero-Moreno, A. (2014). Semen Quality in Criollo Limonero Bulls. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad de Zulia*, 24(6), 528–525.
- Dini, P., Troch, L., Lemahieu, I., Deblende, P., & Daels, P. (2019). Validation of a portable device (iSperm®) for the assessment of stallion sperm motility and concentration. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(8), 1113–1120.
<https://doi.org/10.1111/RDA.13487>
- Durba, M. G., Quirós, C. O. D., de Oca, R. V. M., Valdés, J. A. B., Balmaseda, R. A., & del Risco, E. T. (2008). Influencia del semental, el año y la época de extracción sobre la calidad del eyaculado en toros Siboney de Cuba. *Revista de Producción Animal*, 20(1), 60–64.
- Dyce K. M., Sack W.O., & Wensing C.J.G. (2010). *Tratado de Anatomía Veterinaria* (Editorial El Manual Moderno (ed.); Fourth). Penny Rudolph.
file:///C:/Users/marin/OneDrive/Escritorio/TESE/Bibliografía toro/Richard M. Hopper-Bovine Reproduction-Wiley-Blackwell (2014).pdf
- Espitia, A., Prieto, E., & Cardozo, J. (2006). PUBERTY AND SCROTAL CIRCUMFERENCE IN HOLSTEIN x ZEBU, ZEBU AND ROMOSINUANO BULLS. *Revista MVZ Córdoba*, 11(1), 744–750.
- Eurell Jo. Ann, & Frappier Brian L. (2021). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology* (Sixth Edition, Vol. 6).
- Fonseca, V. O., Souza, C. F., Azevedo, N. A., Oliveira, L. Z., Monteiro, G. A., Cavalcanti, L. F. L., & Molina, L. R. (2019). Parâmetros reprodutivos de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados a pasto, em de diferentes faixas etárias. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 385–392.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-10591>
- Freshman, J. L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small*

- Animal Practice*, 17.3, 104–107. <https://doi.org/10.1053/svms.2002.34326>
- Ghirardosi, M. S., Fischman, M. L., Jorge, A. E., Chan, D., & Cisale, H. (2018). Relationship between morphological abnormalities in commercial bull frozen semen doses and conception rate. *Andrologia*, 50(3), e12884-. <https://doi.org/10.1111/and.12884>
- Hafla, A. N., Lancaster, P. A., Carstens, G. E., Forrest, D. W., Fox, J. T., Forbes, T. D. A., Davis, M. E., Randel, R. D., & Holloway, J. W. (2012). Relationships between feed efficiency, scrotal circumference, and semen quality traits in yearling bulls. *Journal of Animal Science*, 90(11). <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4029>
- Hidalgo, O., Tamargo, C., & Diez, C. (2005). Analisis de semen bovino. *Boletín Informativo de SERIDA, Información Ganadera*, 2, 39–43.
- Horst Erich König, & Hans-Georg Liebich. (2016). *Anatomia dos animais domésticos- 7 ed: Texto e atlas colorido* (Thieme (ed.); 7th ed., Issue 2016). 2021. <https://doi.org/DOI 10.1055/b-007-167437>
- Izquierdo, A. C., Gutiérrez, J. F. P., Hernández, W. M., Mancera, A. E. V., & Crispín, R. H. (2016). Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Revista Veterinaria*.
- Jiménez-Severiano, H., Quintal-Franco, J., Vega-Murillo, V., Zanella, E., Wehrman, M. E., Lindsey, B. R., Melvin, E. J., & Kinder, J. E. (2003). Season of the year influences testosterone secretion in bulls administered luteinizing hormone. *Journal of Animal Science*, 81(4), 1023–1029. <https://doi.org/10.2527/2003.8141023X>
- Kastelic, J. P. (2014). Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology*, 81(1). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.001>
- Lucía E. Rangel Porta, Marco A. Alarcón Zapata, Carlos Galina Hidalgo, Joel Hernández Cerón, Antonio Ismael Porras Almeraya, & Javier de Jesús Valencia. (2009). Manual de Prácticas de Reproducción Animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. In Porras Almeraya Antonio Ismael & Páramo Ramírez Rosa María (Eds.), *Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* (1ª).

- Lunstra, D. D., Ford, J. J., & Echtenkamp, S. E. (1978). Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *Journal of Animal Science*, 46(4), 1054–1062. <https://doi.org/10.2527/jas1978.4641054x>
- Maree, L. (2021). Standard Semen Analysis: Computer-Assisted Semen Analysis. In *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction* (Vol. 11, pp. 11–22). <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/9781108878715.005>
- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A., & Peña, A. I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 101(3), 175–191.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. W. (2008). *Veterinary reproduction and obstetrics*. 10, 837.
- Penitente-Filho, J. M., Silva, F. F. e., Facioni Guimarães, S., Waddington, B., da Costa, E. P., Gomez León, V., Siqueira, J. B., Silva Okano, D., Piccolo Maitan, P., & Guimarães, J. D. (2018). Relationship of testicular biometry with semen variables in breeding soundness evaluation of Nelore bulls. *Animal Reproduction Science*, 196, 168–175. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.07.010>
- Ptaszynska M, & Molina J. (2007). Compendium de reproducción animal. *Intervet*, Ed. 9na, 11–12.
https://www.academia.edu/45591482/Compendium_de_reproducción_animal_M_Ptaszynska_J_Molina
- Richard M. Hopper. (2021). *Bovine Reproduction* (I. John Wiley & Sons (ed.); Second).
- Rosete Fernández, J. V., Álvarez Gallardo, H., Urbán Duarte, D., Fragoso Islas, A., Asprón Pelayo, M. A., Rios Utrera, A., Pérez Reynozo, S., & De La Torre Sánchez, J. F. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12, 39–78. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Senger, P. L. (2005). Pathways to Pregnancy and Parturition. *Psychiatric Rehabilitation Journal*, 3(1), 202–227. <https://doi.org/10.2975/35.1.2011.29.36>
- Sequeira, L. T. (2015). *ANDROLOGIA E INSEMINACION ARTIFICIAL* (1ª).

- Repositorio Institucional, Universidad Nacional Agraria.
<https://repositorio.una.edu.ni/3183/1/nl10s480.pdf>
- Shukla M.K. (2020). *Applied Veterinary Andrology and Frozen Semen Technology* (New India Publishing Agency (ed.)). 2023.
- Sieme, H. (2009). Semen Evaluation. In *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (pp. 57–74). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5234-0.00006-4>
- Silva, M. K. F. da, Borges, M. S., De Paula, R. R., Souza, L. F. C. de, Afonso, F. A., Alves, L. A., Pytilak, E. P., Souza, M. M., & Crespilho, A. M. (2022). Comparação de diferentes métodos para avaliação da concentração espermática bovina: existem opções a serem comparadas ao NucleoCounter®? / Comparison of different methods to access bull sperm concentration: are there options to be compared to NucleoCounter®? *Brazilian Journal of Development*, 8(6). <https://doi.org/10.34117/bjdv8n6-340>
- Snoj, T., Kobal, S., & Majdic, G. (2013). Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different Bos taurus breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology*, 79(5). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.014>
- Stumpf, T. T., Wolfe, M. W., Roberson, M. S., Kittok, R. J., & Kinder, J. E. (1993). Season of the year influences concentration and pattern of gonadotropins and testosterone in circulation of the bovine male. *Biology of Reproduction*, 49(5), 1089–1095. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.5.1089>
- Susilawati, T., Sholikah, N., Wahjuningsih, S., Herwiyanti, E., Kuswati, & Yekti, A. P. A. (2020). Relationship of Scrotal Circumference with Spermatozoa Production in Various Breed of Indonesian Local Bulls. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 15(2), 102–107. <https://doi.org/10.3844/AJAVSP.2020.102.107>
- Torrado, I., Aranda, M. L., Gómez-Arrones, V., Bravo, J. A., & Constantino, J. A. (2016). Utilización de la electroeyaculación para la evaluación de la aptitudreproductiva potencial del toro en sistemas extensivos en la comunidad autónoma de Extremadura. *Archivos de Zootecnia*, 65(251), 327–332.
- Wahyudi, I., Qalfin, M., Susanti, R., & Widiatningrum, T. (2022). Relationship between Scrotal Circumference and Quality of Semen Production in Bulls: A

Meta-Analysis Review. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 17(3), 159–169.

<https://doi.org/10.31186/JSPI.ID.17.3.159-169>

Walker, W. H., & Cheng, J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells.

Reproduction (Cambridge, England), 130(1), 15–28.

<https://doi.org/10.1530/REP.1.00358>