

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**Ecotextura testicular e suas correlações com a espermatogênese de
touro Nelore**

WANESSA DIAS

CAMPO GRANDE – MS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**Ecotextura testicular e suas correlações com a espermatogênese de
touro Nelore**
*Testicular echotexture and their correlation with spermatogenesis in
Nelore*

WANESSA DIAS

Orientador: Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal. Área de
concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE – MS

2015

Certificado de aprovação

WANESSA DIAS

Ecotextura testicular e suas correlações com a espermatogênese de touros nelore

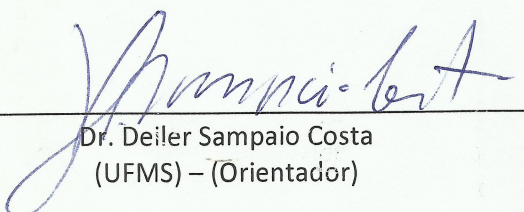
Testicular echotexture and their correlation with spermatogenesis in nellore

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestra em Ciência Animal.

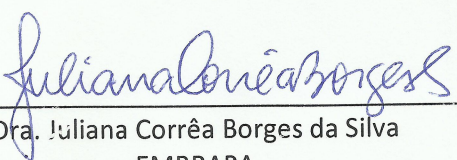
Área de concentração: Produção
Animal.

Aprovado(a) em: 27/02/2015

BANCA EXAMINADORA:


Dr. Deiler Sampaio Costa
(UFMS) – (Orientador)


Dra. Thyara de Deco Souza
UFMS


Dra. Juliana Corrêa Borges da Silva
EMBRAPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Herculano Dias Assis e Neide Antonia Suriano,

A minha filha Stella Dias Menezes,

Ao Prof: Dr. Deiler Sampaio Costa,

Ao Prof: Dr. Fábio José Carvalho Faria,

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela coragem concedida, força e persistência para continuar lutando e vencendo obstáculos na vida.

A minha filha Stella Dias Menezes, que é a razão da minha vida, que amo tanto, pela compreensão e por sempre estar do meu lado.

A minha família que sempre me apoiou e esteve em meu coração.

Ao Prof: Dr. Deiler Sampaio Costa, pela oportunidade, atitudes, ensinamentos e incentivo.

Ao Prof: Dr. Fábio José Carvalho Faria, pela co-orientação, apoio e conselhos.

A Prof: Dra. Thyara de Deco Souza e Araujo e Dra. Juliana Corrêa Borges Silva, membros das bancas de qualificação e defesa, pelas considerações e conselhos para o enriquecimento do meu conhecimento.

Ao NUPRA, pelo apoio e pela forma produtiva de aprendizado e bons momentos.

A FUNDECT, pela oportunidade e concessão de bolsa Mestrado.

A todas as pessoas que fazem parte da minha vida e que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho e minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

DIAS, W. Ecotextura testicular e suas correlações com a espermatogênese de touros Nelore. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a ecotextura testicular e suas correlações com a espermatogênese de touros Nelore. Utilizaram-se 41 touros púberes com idade variando de 3 a 5 anos e peso corporal médio de $510,2 \pm 21,61\text{kg}$. Os exames ultrassonográficos foram realizados com auxílio de um aparelho de ultrassonografia portátil acoplado a um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz. Para avaliação da ecotextura uma camada de gel foi aplicada sobre a área de leitura do transdutor, que foi posicionado verticalmente na face caudal do escroto, paralelo ao maior eixo de cada testículo. Imediatamente após esse exame os animais foram orquidectomizados e em seguida, os testículos foram fixados por perfusão tecidual com solução de fixadora de Karnovsky. Em seguida, os fragmentos foram incluídos com glicolmetacrilato e corados com solução de azul de toluidina - borato de sódio a 1%. A média da intensidade de pixel da área de 1600mm^2 do parênquima testicular direito, esquerdo e média de intensidade de pixel entre os dois testículos em cada animal foram respectivamente, $105,22 \pm 13,58$, $107,95 \pm 12,82$ e $106,59 \pm 11,43$. A média do coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais: razão entre o número de espermatócitos primários em (PL/L) e o número de espermatogônias A foi de 19,74. O rendimento meiótico: razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatócitos primários em paquíteno foi de 2,63. O rendimento geral da espermatogênese: razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatogônias A foi de 52,0. Não houve correlação ($p > 0,05$) entre a ecotextura testicular e nenhum dos parâmetros morfométricos da espermatogênese mensurados. Concluiu-se que a ecotextura testicular não é um método viável para a avaliação indireta da população celular do epitélio seminífero, do rendimento intrínseco da espermatogênese e do índice de células de Sertoli de touros Nelore.

Palavras-chave: parênquima testicular, morfometria, ultrassonografia, bovino

ABSTRACT

DIAS, W. Testicular echotexture and their correlation with spermatogenesis in Nellore. 2015. Dissertação (Mestrado) – Veterinary Medicine and Animal Science College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

The aim of this research was to evaluate the testicular echotexture and their correlation with spermatogenesis of Nellore bulls. We used 41 pubertal bulls aged 3-5 years and mean body weight of $510.2 \pm 21,61\text{kg}$. The ultrasound examinations were performed with aid of a portable ultrasound device attached to a linear transducer with a frequency of 7.5 MHz. For echotexture evaluation a gel layer was applied on the transducer reading area, which was positioned vertically in the face scrotum flow parallel to the major axis of each testis. Immediately after this test animals were orchidectomized and then the testes were fixed by tissue perfusion with Karnovsky solution. Then the fragments were included with glycolmethacrylate stained with toluidine blue solution - Sodium borate 1% .The average pixel intensity of the area of 1600 mm^2 of testicular parenchyma and pixel intensity averaging both testicles in each animal were respectively 105.22 ± 13.58 , 107.95 ± 12.82 and 106.59 ± 11.43 . The average of the coefficient mitosis spermatogonial efficiency ratio: ratio of the number of primary spermatocytes (PL / L) and the number of spermatogonia A was 19.74. The meiotic yield: ratio of the number of round spermatids and the number of primary pachytene spermatocytes was 2.63. The spermatogenesis efficiency: ratio between the number of round spermatids and the number of spermatogonia A was 52.0. There was no correlation ($p > 0.05$) between the testicular echotexture with any of the morphometric parameters measured spermatogenesis. It was concluded that the testicular echotexture is not a viable method for the indirect evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium, the intrinsic efficiency of spermatogenesis and Sertoli cell index of Nellore bulls.

Keywords: testicular parenchyma, morphometry, ultrasonography, bovine

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intensidade de pixel média do parênquima testicular direito (IPTD), esquerdo (IPTE) e média de intensidade de pixel entre os dois testículos (IPMED) de touros Nelore sexualmente maduros.	18
Tabela 2 - População celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros Nelore.	199
Tabela 3 - Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero em touros Nelore.	199
Tabela 4 - Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e de células de Sertoli (CS) em touros Nelore.	20
Tabela 5 – Coeficientes de correlação (r) entre a ecotextura do parênquima testicular direito (EcoTD), ecotextura do parênquima testicular esquerdo (EcoTE) e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo (EcoMed) com população celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros Nelore.	20
Tabela 6 – Coeficientes de correlação (r) entre a ecotextura do parênquima testicular direito (EcoTD), ecotextura do parênquima testicular esquerdo (EcoTE) e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo (EcoMed) com o rendimento intrínseco da espermatogênese de touros Nelore	21
Tabela 7 - Coeficientes de correlação (r) entre a ecotextura do parênquima testicular direito (EcoTD), ecotextura do parênquima testicular esquerdo (EcoTE) e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo (EcoMed) com as razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli em touros Nelore.	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ultrassonográfica do parênquima testicular de touro Nelore sexualmente maduro, evidenciando o mediastino, a túnica albugínea e o quando de seleção (1600 mm²) da área de avaliação da intensidade de pixel.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	Animais.....	13
2.2	Avaliação ultrassonográfica do parênquima testicular.....	13
2.3	Processamento histológico	14
2.4	Avaliações histométricas do processo espermatogênico	14
2.4.1	Cálculo da população célula.....	14
2.4.2	Rendimento intrínseco da espermatogênese	15
2.4.3	Índice de células de Sertoli.....	16
2.4.4	Análise estatística.....	16
3	RESULTADOS	17
4	DISCUSSÃO	22
5	CONCLUSÃO	26
6	REFERÊNCIA.....	27

1 INTRODUÇÃO

A avaliação ultrassonográfica dos testículos de bovinos começou a ser realizada a partir da década de 80, quando Pechman e Eilts (1987) descreveram a anatomia dos testículos de touros em matadouro. Os autores relataram que a ecotextura do parênquima testicular de animais sem alterações patológicas apresentou-se homogênea e moderadamente ecogênica. Em seguida, Coulter e Bailey (1998) constataram que o exame dos testículos de bovinos com o auxílio do aparelho de ultrassonografia não afeta a qualidade do ejaculado, tampouco altera a consistência testicular e a produção espermática diária após o período de avaliação.

A análise computacional dos atributos de imagens é uma extensão natural dos avanços em diagnóstico ultrassonográfico. A técnica é baseada na identificação, quadro a quadro (pixel), da intensidade do retorno da onda ultrassonográfica. Cada pixel que compõe a imagem representa um discreto reflexo do tecido e pode assumir um dos 256 tons da escala de cinza, que varia de totalmente preto (0) a totalmente branco (255), (Singh et al., 1998). A combinação de milhares de pixels forma uma imagem. A densidade e as características do tecido podem ser observadas via ultrassom, mas não quantificadas pelo olho humano. Visualmente, pode-se distinguir somente 18 a 20 tons de cinza, o que leva a diferentes percepções individuais e, conseqüentemente, variações na interpretação da imagem (Pierson et al., 1995). A análise computacional permite identificar diferenças de ecotextura imperceptíveis ao olho humano, assim como mensurá-las de forma bastante objetiva, pelo estabelecimento de algoritmos computacionais. Estes algoritmos têm sido desenvolvidos especificamente para análises de imagens de ultrassom com o objetivo de reduzir a subjetividade da avaliação visual, quantificando os valores de cada pixel da imagem (Singh et al., 2003).

Assim sendo, alguns pesquisadores vêm tentando correlacionar achados ultrassonográficos com patologias testiculares (Eilts e Pechman, 1988), efeitos da degeneração testicular induzida por insulação (Brito et al., 2003; Arteaga et al., 2005), produção espermática diária e qualidade do ejaculado (Kastelic et al., 2001), desenvolvimento testicular (Silva et al., 1997) e lesões fibróticas no parênquima testicular (Barth et al., 2008).

Entretanto, a ultrassonografia ainda tem sido pouco utilizada como uma ferramenta de diagnóstico no exame andrológico, provavelmente porque em algumas das pesquisas supracitadas foram encontradas baixas correlações entre achados clínicos e ecogenicidade do parênquima testicular (Eilts e Pechman, 1988; Brito et al., 2003). Contudo, apesar de alguns

dados preliminares ainda serem conflitantes, acredita-se que em pouco tempo a ultrassonografia será uma ferramenta indispensável para a avaliação de um reprodutor, a exemplo do que já tem ocorrido com a avaliação ginecológica das fêmeas (Siqueira e Viana, 2006).

A espermatogênese é um processo sincrônico onde a espermatogônia diploide se diferencia em célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. Este processo ocorre nos túbulos seminíferos, nos mamíferos tem duração média de 40 a 60 dias (França e Russell, 1998). De acordo com Costa e Paula (2003), é fundamental a compreensão do processo espermatogênico para que se possa otimizar a utilização de um reprodutor.

Assim sendo, ainda não existe um método eficiente, que seja bem aceito pelos produtores, e que possa ser utilizado para selecionar os touros com maior produção espermática diária (PED). Existem grandes diferenças individuais na PED quando comparamos touros zebuínos sexualmente maduros (Andreussi et al., 2013). Portanto, a avaliação da espermatogênese possibilitaria selecionar aqueles animais geneticamente superiores, colaborando sobremaneira com o melhoramento genético da espécie.

Um grande avanço poderia ser alcançado nos estudos da fisiologia reprodutiva dos touros caso fosse possível utilizar um método menos invasivo e com maior repetibilidade para avaliação da espermatogênese desses animais. Atualmente, esta análise só pode ser feita após orquidectomia ou por biópsia testicular. A orquidectomia, por motivos óbvios, inviabiliza qualquer exame de um reprodutor em uso, tendo sua aplicação restrita a pesquisa científica. Por sua vez a biópsia testicular, apesar de ser uma técnica segura e demandar dois a três meses para que o reprodutor retome sua plena produção (Heath et al., 2002), ainda é vista com muitas restrições pelos proprietários, que na grande maioria das vezes não aceitam submeter seus animais a este procedimento.

Logo, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a ecotextura testicular e suas correlações com a espermatogênese de touros Nelore, determinando-se as possíveis relações entre a ecotextura do parênquima testicular com a população celular do epitélio seminífero, o rendimento intrínseco da espermatogênese e o índice de células de Sertoli.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Utilizaram-se 41 touros Nelore púberes, provenientes de uma mesma fazenda localizada no Centro Norte de Mato Grosso do Sul latitude 19°57'11" sul e longitude 54°53'33" oeste. A idade dos animais variou de 3 a 5 anos e o peso corporal médio de $510,2 \pm 21,61$ kg. Os animais foram criados em sistema extensivo com pastagem predominantemente *Urocloa decumbens* e sal mineral *ad libitum*. Todos os animais foram submetidos ao exame clínico dos testículos a fim de eliminar aqueles reprodutores com eventuais alterações clínicas nas gônadas, tais como degenerações, tumores, ectoparasitas, assimetrias e fibroses.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo número 623/2014).

2.2 Avaliação ultrassonográfica do parênquima testicular

Os exames foram realizados com auxílio de um aparelho de ultrassonografia portátil (Mindray DP 2200) acoplado a um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz, no dia em que os animais foram submetidos à orquidectomia. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo técnico e as configurações do aparelho de ultrassom (ganhos proximal, distal e total; área de foco; brilho e contraste) foram padronizados em valores pré-determinados e iguais durante todo o experimento.

Uma camada de gel foi aplicada sobre a área de leitura do transdutor, que foi posicionado verticalmente na face caudal do escroto, paralelo ao maior eixo de cada testículo, procedendo-se uma pressão mínima suficiente para capturar a imagem (Arteaga et al., 2005).

As imagens congeladas, obtidas da porção média entre o mediastino e a túnica albugínea, com o mínimo de artefatos (refração, dispersão e atenuação das ondas ultrassônicas), foram gravadas em formato não compactado, extensão bmp e 256 tons de cinza.

A quantificação da ecotextura das imagens ultrassonográficas salvas foram realizadas com o auxílio do “software” ImageJ 1.34s (Rasband, 2005). Após a seleção de uma área

específica do parênquima testicular, a tonalidade de cinza de cada pixel que compõe a região selecionada foi calculada pelo “software” e representada numericamente em uma escala de 256 tons de cinza, na qual zero representa um pixel de tonalidade totalmente preta e 255 um pixel de tonalidade totalmente branca. A área de selecionada para avaliação da média de pixels foi de 1600mm², conforme preconizado por Pinho et al., (2013).

2.3 Processamento histológico

Logo após a avaliação ultrassonográfica os animais foram orquidectomizados, o epidídimo foi dissecado e a artéria testicular foi canulada para perfusão com solução salina a 0,9%, contendo 5.000 UI de heparina por litro de solução, durante pelo menos 15 minutos em temperatura ambiente. Imediatamente após esse procedimento, os testículos foram perfundidos com solução fixadora de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 5% em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,4), por vinte minutos, também a temperatura ambiente. Os frascos contendo as soluções que foram perfundidas mantiveram-se a uma altura de 120 cm acima do testículo para garantir a manutenção de pressão de aproximadamente 80 mmHg.

Fragmentos do parênquima testicular com dimensões de aproximadamente 8,0 x 5,0 x 3,0 mm foram colhidos do terço médio do órgão e em seguida refixados por imersão em nova solução de Karnovsky, por mais 24 horas. Logo após, foram armazenados em tampão fosfato sob refrigeração, por no máximo cinco dias até seu processamento.

Os fragmentos do parênquima testicular foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e incluídos em solução de glicol metacrilato, conforme Costa et al. (2004). Por fim, com o uso de um micrótomo com navalha de vidro foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura e corados com solução de azul de toluidina - borato de sódio a 1% e as lâminas montadas com Entellan® (Merk), segundo técnica de rotina.

2.4 Avaliações histométricas do processo espermatogênico

2.4.1 Cálculo da população célula

A população de cada tipo celular do epitélio seminífero foi estimada a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e dos nucléolos das células de Sertoli, em pelo

menos 20 secções transversais no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES), caracterizados pelo método da morfologia tubular (Ortavant et al., 1977).

Os seguintes tipos celulares foram contados:

- Espermatogônias do tipo A (A),
- Espermatócitos primários em pré-leptóteno/ leptóteno (PL/L),
- Espermatócitos primários em paquíteno (PQ),
- Espermátides arredondadas (Ar),
- Células de Sertoli (CS).

A contagem obtida foi corrigida para o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a formula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962). Uma vez que as células de Sertoli possuem núcleo irregular, a correção do número das mesmas foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio (Costa et al., 2004).

A contagem da população celular bem como a mensuração do diâmetro nuclear ou nucleolar médio foram feitas com auxílio do software de morfometria “ImageJ 1.34s” (Rasband, 2005), utilizando-se imagens microscópicas digitalizadas.

2.4.2 Rendimento intrínseco da espermatogênese

O rendimento intrínseco da espermatogênese foi estimado com base nas razões encontradas entre os números celulares corrigidos obtidos por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero conforme preconizado por Costa et al.(2007). As seguintes razões foram calculadas:

- O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais: razão entre o numero de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e o número de espermatogônias do tipo A,
- O rendimento meiótico; razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatócitos primários em paquíteno,
- O rendimento geral da espermatogênese: razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatogônias do tipo A,
- A ocorrência de perdas celulares durante a prófase meiótica: razão entre o número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e o número de espermatócitos primários em paquíteno.

2.4.3 Índice de células de Sertoli

O índice de células de Sertoli foi determinado a partir das razões encontradas entre os números corrigidos de células germinativas e o número corrigido de células de Sertoli, obtidas no estágio 1 do CES. As seguintes razões foram calculadas:

- Razão entre o número de espermatogônias do tipo A e o número de células de Sertoli,
- Razão entre o número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e o número de células de Sertoli,
- Razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de células de Sertoli,
- Razão entre o número total de células germinativas e o número de células de Sertoli.

2.4.4 Análise estatística

As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey. A correlação de Pearson foi utilizada entre a ecotextura do parênquima testicular e parâmetros morfométricos da espermatogênese. O nível de significância considerado foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com auxílio do “software” BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003).

3 RESULTADOS

A ecotextura do parênquima testicular dos 41 touros Nelore apresentou-se homogêneo e moderadamente ecogênico (Figura 1). A média da intensidade de pixel da área de 1600mm² do parênquima testicular direito, esquerdo e média de intensidade de pixel entre os dois testículos em cada animal foram respectivamente, 105,22±13,58, 107,95±12,82 e 106,59±11,43 (tabela 1).

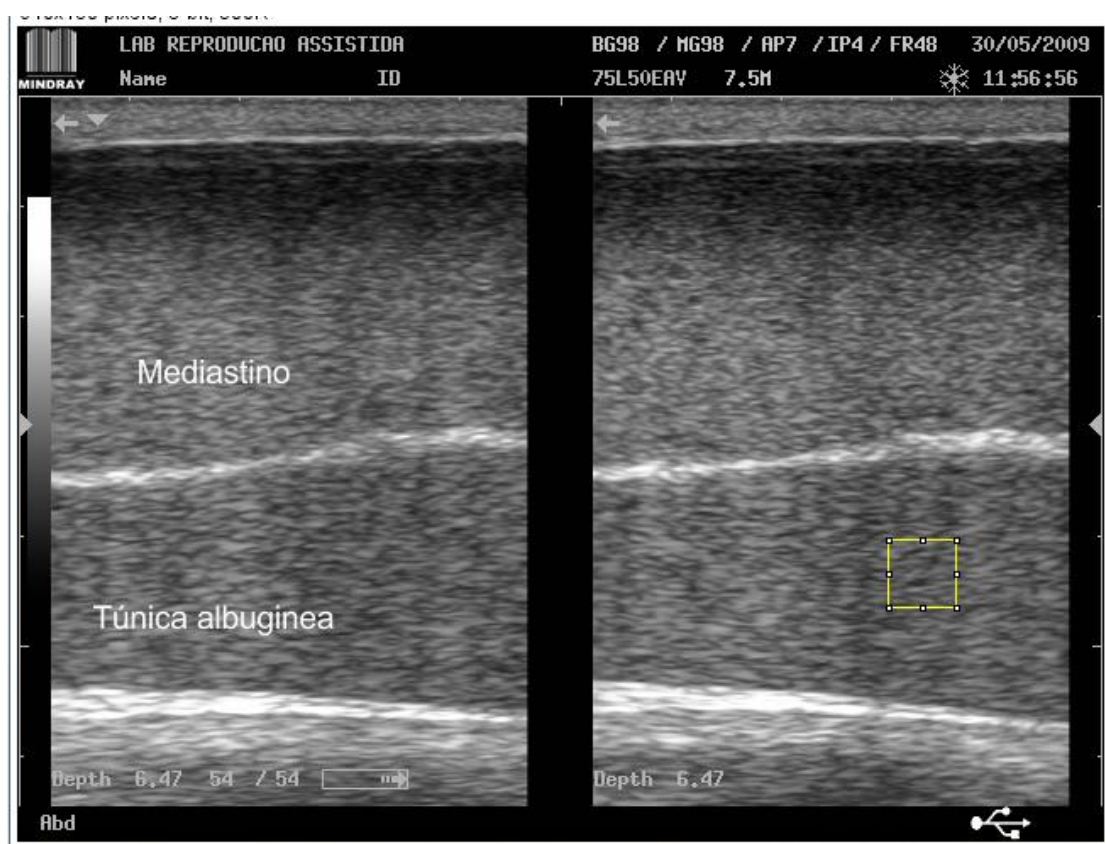


Figura 1. Imagem ultrassonográfica do parênquima testicular de touro Nelore sexualmente maduro, evidenciando o mediastino, a túnica albugínea e o quando de seleção (1600 mm²) da área de avaliação da intensidade de pixel.

Tabela 1 - Intensidade de pixel média do parênquima testicular direito (IPTD), esquerdo (IPTE) e intensidade de pixel média entre os dois testículos (IPMED) de touros Nelores sexualmente maduros.

Animal	IPTD	IPTE	IPMED	Animal	IPTD	IPTE	IPMED
1	126,551	102,892	114,722	22	93,091	92,252	92,672
2	109,328	117,713	113,521	23	106,004	118,354	112,179
3	102,731	97,335	100,033	24	127,495	127,084	127,290
4	87,861	83,532	85,697	25	104,156	109,473	106,815
5	117,241	94,939	106,090	26	125,196	102,286	113,741
6	123,846	127,255	125,551	27	119,172	121,158	120,165
7	101,740	94,303	98,022	28	116,064	127,092	121,578
8	91,884	105,411	98,648	29	123,726	117,694	120,710
9	95,366	117,957	106,662	30	111,126	108,545	109,836
10	90,239	98,223	94,231	31	102,598	124,446	113,522
11	91,271	103,688	97,480	32	113,513	114,690	114,102
12	89,321	101,687	95,504	33	102,118	102,535	102,327
13	108,472	111,161	109,817	34	73,566	78,482	76,024
14	112,096	99,422	105,759	35	121,278	123,719	122,499
15	92,651	94,809	93,730	36	95,854	105,781	100,818
16	108,304	117,352	112,828	37	104,889	123,339	114,114
17	93,144	102,987	98,066	38	100,324	107,501	103,913
18	99,644	93,124	96,384	39	126,835	95,539	111,187
19	113,150	114,798	113,974	40	107,791	124,286	116,039
20	87,816	87,688	87,752	41	80,794	118,797	99,796
21	115,981	116,528	116,255				
				Médias	105,22	107,95	106,59
				DP*	13,58	12,82	11,43

*DP = desvio padrão

O número médio de cada tipo celular constituinte do epitélio seminífero de túbulos, seccionados transversalmente, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros Nelore encontra-se apresentado na tabela 2.

Tabela 1 - População celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros Nelore.

Tipo Celular	Média ± dp
Células de Sertoli	4,06 ± 0,50
Espermatogônias A	1,90 ± 0,22
Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno	36,87 ± 3,50
Espermatócitos primários em paquíteno	36,83 ± 3,27
Espermátides arredondadas	96,97 ± 18,30

Número obtido através da contagem de 20 secções transversais de túbulos seminíferos por animal (n=41).
Valores corrigidos segundo Amann (1962).
dp = desvio padrão das médias.

O rendimento intrínseco da espermatogênese, estimado com base nas razões encontradas entre os números celulares corrigidos obtidos por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do CES encontram-se apresentadas na tabela 3.

Tabela 2 - Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero em touros Nelore.

Tipos Celulares	Média ± DP
Pré-leptóteno/leptóteno (PL/L): Espermatogônias A	19,74 ± 3,19
Paquíteno (PQ): PL/L	1,00 ± 0,04
Espermátides arredondadas (Ar): PQ	2,63 ± 0,45
Ar: Espermatogônias A	52,05 ± 12,37

A: Espermatogônias do tipo A. PL/L: Espermatócitos primários em pré-leptótone/leptótone. PQ: Espermatócitos primários em Paquíteno. Ar: Espermátides arredondadas.

O índice de células de Sertoli encontra-se apresentado na tabela 4. Nota-se que cada célula de Sertoli é capaz de suportar, em média, em torno de 43 células germinativas.

Tabela 3 - Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e de células de Sertoli (CS) em touros Nelore.

Tipos celulares	Média ± DP
Espermatogônia A: CS	0,47 ± 0,08
Pré-leptóteno (PL/L): CS	9,20 ± 1,33
Paquíteno (PQ): CS	9,19 ± 1,29
Espermátides arredondadas (Ar): CS	24,04 ± 4,62
Total de células germinativas: CS	42,89 ± 6,32

CS: Células de Sertoli. A: Espermatogônias do tipo A. PL/L: Espermatócitos primários em pré-leptótone/leptótone. PQ: Espermatócitos primários em Paquíteno. Ar: Espermátides arredondadas.

As correlações entre a ecotextura do parênquima testicular direito, esquerdo e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo com as razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli de touros Nelore, encontram-se apresentadas, respectivamente nas tabelas 5, 6 e 7. Não houve correlação significativa entre a ecotextura testicular com nenhum dos parâmetros morfométricos da espermatogênese aqui mensurados.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação (r) entre a ecotextura do parênquima testicular direito (EcoTD), ecotextura do parênquima testicular esquerdo (EcoTE) e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo (EcoMed) com população celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de touros Nelore.

	CS	A	PL/L	PQ	Ar
EcoTD	-0.053	0.155	-0.211	-0.110	-0.173
EcoTE	-0.082	-0.005	-0.273	-0.210	-0.131
EcoMed	-0.063	0.141	-0.209	-0.110	-0.173

CS: Células de Sertoli. A: Espermatogônias do tipo A. PL/L: Espermatócitos primários em pré-leptótone/leptótone. PQ: Espermatócitos primários em Paquíteno. Ar: Espermátides arredondadas, (p > 0,05).

Tabela 5 – Coeficientes de correlação (r) entre a ecotextura do parênquima testicular direito (EcoTD), ecotextura do parênquima testicular esquerdo (EcoTE) e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo (EcoMed) com o rendimento intrínseco da espermatogênese de touros Nelore.

	coefmitose	coefmeio	rendgeral	Prófase
EcoTD	-0.249	-0.125	-0.239	0.232
EcoTE	-0.236	0.095	-0.179	0.102
EcoMed	-0.238	-0.128	-0.233	0.231

Coefmitose: Coeficiente de rendimento das mitoses espermatogoniais. Coefmeio: Coeficiente meiótico. Rengeral: Rendimento geral da espermatogênese. Prófase: perdas celulares durante a prófase, ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Coeficientes de correlação (r) entre a ecotextura do parênquima testicular direito (EcoTD), ecotextura do parênquima testicular esquerdo (EcoTE) e ecotextura média do parênquima testicular direito e esquerdo (EcoMed) com as razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli em touros Nelore.

	CS/A	CS/Pl	CS/PQ	CS/Ar	CS/total
EcoTD	0.168	-0.150	-0.036	-0.196	-0.185
EcoTE	0.084	-0.095	-0.091	-0.112	-0.141
EcoMed	0.164	-0.145	-0.032	-0.194	-0.181

CS: Células de Sertoli. A: Espermatogônias do tipo A. PL/L: Espermatócitos primários em pré-leptótone/leptótone. PQ: Espermatócitos primários em Paquíteno. Ar: Espermátides arredondadas. Total: total de células germinativas, ($p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo todos os animais são maduros sexualmente, a ecotextura do parênquima testicular dos animais apresentou-se homogênea e moderadamente ecogênica, conforme Pastore (2008) e Pinho et al., (2013), trabalhando com touros Nelore e por Pechman e Eilts (1987) e Abdel-Razek e Ali (2005), com animais taurinos.

Não houve diferença significativa entre a intensidade de pixel entre o testículo direito e esquerdo, confirmando o observado por Aravindakshan et al., (2000), Cardilli et al., (2009) e Pinho et al., (2013). Essa homogeneidade do parênquima testicular observada pela sua ecotextura, já tinha sido relatada em estudos histológicos da espermatogênese, em que fragmentos retirados das porções capitata, média e caudata do testículo apresentaram contagens morfométricas que não diferiram significativamente entre si (Andreussi et al., 2013).

A intensidade média de pixels entre o parênquima testicular direito e esquerdo dos touros Nelore desta pesquisa (com 3 a 5 anos de idade) foi de 106,59 (Tab 1), valor igual ao relatado por Pinho et al., (2013) trabalhando com touros Nelore jovens (21 a 33 meses). Isso pode ser explicado pelo fato de que apesar da idade dos 41 touros aqui trabalhados ter sido superior a idade dos touros jovens avaliados por Pinho et al., (2013), ambos os grupos eram de animais sexualmente maduros. Outro ponto que deve ser considerado, é que em ambas as pesquisas utilizaram-se o mesmo modelo de ultrassom (Mindray DP 2200 vet) e ajustes das configurações (ganhos próximas, distal e total; área de foco; brilho e contraste) do aparelho. Além disso, a área de pixel avaliada foi a mesma (1600mm^2) em ambas as pesquisas, desta forma as comparações foram mais fidedignas, evitando-se assim variações do resultado inerentes ao equipamento e método utilizados.

Silva et al., (1997) relataram que intensidade média de pixels do parênquima testicular de touros Nelore púberes aos 15,6 meses foi de 163,7. Carmo et al., (2010) avaliando grupos de touros Guzerá na faixa etária de 21 a 24 meses, 24,1 a 27 meses, e de 27,1 a 30 meses, encontrou intensidade média de pixel de $102,3 \pm 46,9$, $112,0 \pm 35,3$ e $127,5 \pm 46,2$, respectivamente. No entanto Cardilli et al., (2009b) relataram média de 115,3 para touros da raça Nelore sexualmente maduros de 18 meses, de idade. Já Gabor et al. (1998) observaram que intensidade média de pixels do testículo de 49 touros Holandeses com 16 a 19 meses de idade, foi de 131,9. Kastelic et al., (2001) trabalhando com touros Angus encontraram média de intensidade de pixels de 158,5. Pinho et al., (2012) trabalhando com touros Montana Tropical encontrou média de intensidade de pixels de 95,7 e 94,0 para

animais aptos e inaptos à reprodução, respectivamente. Brito et al., (2003) relataram que esse índice foi de 196,1; 192,7 e 190,7 para touros *Bos taurus indicus*, cruzados e *Bos taurus taurus*, respectivamente.

Dentre as pesquisas supracitadas os resultados foram semelhantes com a intensidade de pixel do presente estudo, que avaliaram touros sexualmente maduros de raças zebuínas. Essa variação pode estar relacionada ao sistema de criação e alimentação dos animais (Pastore, 2008). Os diferentes ajustes da imagem do aparelho de ultrassonografia produz tonalidades diferentes de escala de cinza, o que influenciaria diretamente a ecotextura do parênquima testicular. Por fim, diferentes áreas de avaliação da intensidade média de pixels poderão produzir diferentes médias na escala de cinza, mesmo quando se avalia o parênquima testicular do mesmo animal (Pinho et al., 2013).

Entretanto, Pinho et al., (2013) trabalhando com touros Nelore (n= 405) e Montana Tropical (n= 52) sexualmente maduros, utilizando o mesmo aparelho de ultrassom (Mindray DP 2200 vet), os mesmos ajustes de imagem e a mesma área de avaliação da média de pixels (1600mm²), não conseguiram encontrar correlação entre a qualidade seminal de touros aptos e inaptos a reprodução com a ecotextura testicular. Evidenciando assim, a baixa eficiência de avaliação indireta da qualidade do ejaculado pela intensidade média de pixels do parênquima testicular.

Kastelic et al., (1997) trabalhando com touros Canchim, Nelore e suas cruzas, observaram correlação da ecotextura testicular com a porcentagem patologias espermáticas, onde a intensidade de branco apresentou curva de regressão negativa com o percentual de defeitos maiores e defeitos totais, ou seja, quanto maior era a ecotextura do parênquima testicular, menor era a porcentagem de patologias espermáticas. Por sua vez, Gabor et al., (1998) encontraram correlação média e negativa ($r = -0,48$) entre a ecotextura testicular e a proporção de espermatozóides vivos de touros Holandeses sexualmente maduros.

Essas diferenças nos resultados de pesquisas que avaliaram a relação entre ecotextura testicular e qualidade seminal podem ser parcialmente explicadas devido ao fato de que os espermatozoides ejaculados começaram a ser produzidos pelo menos 70 dias antes de estarem disponíveis para serem liberados no ejaculado na cauda do epidídimo (63 dias de duração da espermatogênese mais sete dias de tempo gasto para o trânsito pelo epidídimo (Consentino et al., 1984).

Nenhum artigo foi encontrado na literatura científica sobre as possíveis relações entre a ecotextura testicular e a morfometria da espermatogênese na espécie bovina. Assim sendo,

não foi possível estabelecer comparações entre os dados aqui encontrados com de outros pesquisadores. Uma única pesquisa nesta área foi desenvolvida em nosso laboratório, em que se avaliou a relação da espermatogênese com a ecotextura testicular de cavalos Pantaneiros (Varoni, 2014). Nesse estudo, os autores avaliaram a intensidade de pixels do parênquima testicular de 22 garanhões de 3 a 6 anos de idade e encontraram correlação apenas ($r=0,4$) com a proporção de lúmen tubular e com a população de espermatogônias do tipo A ($r=-0,5$) no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES). Em relação aos outros parâmetros morfométricos, como o rendimento intrínseco da espermatogênese, índices de células de Sertoli, produção espermática diária e população dos demais tipos celulares do epitélio seminífero no estágio 1 do CES, não houve correlação ($p > 0,05$).

A correlação entre o percentual de lume tubular e a ecotextura testicular já tinha sido relatada por outros pesquisadores quando avaliavam o parênquima testicular de animais pré-púberes e púberes, em que se observou que a intensidade de pixels aumenta com a idade, e esse aumento estaria principalmente relacionado ao aparecimento e desenvolvimento do lume tubular (Pechman e Eilts 1987; Chandolia et al., 1997; Aravindakshan et al., 2000; Brito et al., 2004; Abdel-Razek e Ali, 2005; Pastore, 2008).

Assim sendo, a correlação da ecotextura testicular com aspectos reprodutivos como espermatogênese e qualidade sexual tem apresentado resultados contraditórios (Kastelic et al., 1997; Brito et al., 2003; Pinho et al., 2013) dificultando que essa ferramenta diagnóstica seja uma alternativa viável como teste complementar para avaliação de um reprodutor. Os resultados aqui obtidos confirmam tal assertiva, pois a falta de correlação dos parâmetros morfométricos da espermatogênese com a ecotextura testicular, revelam que não é viável o uso deste método para avaliar indiretamente a espermatogênese de touros sexualmente maduros.

As variáveis morfométricas da espermatogênese aqui avaliadas foram muito semelhantes ao relatado por outros pesquisadores que fizeram estudos histológicos deste processo em touros Nelore (Cardoso 1981, Andreussi et al., 2013), indicando que os resultados aqui obtidos eram representativos da raça.

Usualmente são utilizadas algumas razões numéricas entre espermatogônias A e os demais tipos celulares por secção transversal de túbulos seminíferos para caracterizar a eficiência da espermatogênese (Costa et al., 2004, Costa et al., 2007). Tais razões, além de permitir em comparações entre espécies diferentes, possibilitam a quantificação das perdas que ocorrem durante os processos de divisão e diferenciação celular, ou seja, auxiliariam

sobremaneira na seleção de reprodutores caso pudesse ser realizado por um método menos invasivo e de alta repetibilidade.

Cada célula de Sertoli dos touros avaliados foi capaz de suportar um total de 43 células germinativas (Tabela 4). As razões entre o número de células de Sertoli e de células germinativas em secções transversais de túbulos seminíferos são referidas na literatura como índice de células de Sertoli (Costa e Paula, 2003). Esse índice pode ser interpretado como sendo a capacidade de suporte das células de Sertoli (Russel e Peterson, 1984; Sharpe, 1994), ou seja, o número de células germinativas que uma célula de Sertoli pode dar suporte estrutural e nutricional; e também como um indicativo da eficiência de produção espermática. Sendo, portanto, o melhor reflexo da eficiência funcional das células de Sertoli (França e Russell, 1998). Se tal informação pudesse ser avaliada por um método não invasivo e com alta repetibilidade, poderia ser determinante para escolha ou descarte de um reprodutor, pois quando maior a capacidade de suporte de uma célula de Sertoli, maior a possibilidade de que este indivíduo produza um maior número de espermatozoides por grama de parênquima testicular (Costa e Paula, 2003).

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a ecotextura testicular não é um método viável para se avaliação indireta da população celular do epitélio seminífero, do rendimento intrínseco da espermatogênese e do índice de células de Sertoli de touros Nelore.

6 REFERÊNCIA

- ABDEL-RAZEK, A.KH., ALI, A. Development Changes of Bull (*Bos taurus*) Genitalia as Evaluated by Caliper and Ultrasonography. Repr. Dom. An. v.40, p.23-27, 2005.
- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. Anat. Rec. v. 94, p. 238-248, 1946.
- AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. Am. J. Anat. v.110, p.49-67, 1962. An. Sci.Artigo no prelo, 1962.
- ANDREUSSI, P.A.T.; COSTA, D.S.; FARIA, F.J.C.; FERNANDES, C.A.C.; SANTOS M.D.; SILVA J.C.B. Testicular Histomorphometric Evaluation of Zebu Bull Breeds. Braz. Arch. Biol. Technol. v.57 n.6: p. 900-907, 2013.
- ARAVINDAKSHAN, J.P.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Pattern of gonadotropin secretion and 338 ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. Theriogenology, v.54, p.339-354, 2000.
- ARTEAGA, A.A.; BARTH, A.D.; BRITO, L.F.C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. Theriogenology, v. 64, p.408-415, 2005.
- AYRES, M.; AYRES JR. M., AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. Bio Estat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém, Sociedade Civil Maniraua, Brasília CNPq, 2003.
- BARTH, A.D.; ALISIO, L.; AVILÉS, M. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. An. Repr. Sci. v.106, p.274-288, 2008.
- BRITO, L.; SILVA, A.; BARBOSA, R.; UNANIAN, M.; KASTELIC, J. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. An. Reprod. Sci. v.79, p. 1-15, 2003.

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

CARDILLI, D.J.; TONIOLLO, G.H.; PASTORE, A.A., CANOLA, C.J.; MERCADANTE, Z.E.M.; OLIVEIRA, A.J. Alterações do padrão ultrassonográfico do parênquima testicular em bovinos jovens da raça Nelore. *Acta Sci. Vet.* v.37, n.4, p.10-13, 2009.

CARDILLI, D.J.; TONIOLLO, G.H.; PASTORE, A.A.; et al. Ultrasonographic study of testicular development in young Nelore bulls raised in extensive management system. *An.Repr.v.6 (Suppl.1)*, p.252, 2009b.

CARDOSO, F.M. Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebu (*Bos indicus*). Belo Horizonte: UFMG. Thesis - Federal University of Minas Gerais. p.208, 1981.

CARMO, A.S.; OSORIO, J.P.; MENDONÇA, L.F.; et al. Biometric and Ultrasonographic aspects of testicular development of Guzarat bulls (*Bos taurus indicus*) *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* Artigo no prelo, 2010.

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

COSENTINO, M.J.; TAKIHARA, H.; BURHOP, J.W.; COCKETT, A.T. Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandinas. *Journal of the Andrology*, v.72, p.216-222, 1984.

COSTA, D.S.; HENRY, M.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese de Catetos (*Tayassu tajacu*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.56, p.46-51, 2004.

COSTA, D.S.; MENEZES, C.M.C.; TARCÍZIO, A.R.P. Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) *Animal Reproduction Science* v.98, p. 322–334, 2007.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia*, v.4, p.53-72, 2003.

COULTER, G.H.; BAILEY, D.R.C. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology*, v.30, n.4, p.743-749, 1998.

EILTS, B.E.; PECHMAN, R.D. B-mode ultrasound observations of bulls testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology*, v.30, p.1169-1175, 1988.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, F. (Eds). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid. p.197-219, 1998.

GABOR, G.; SASSER, R.G.; KASTELIC, J.P.; MÉZES, M.; FALKAY, G.; BOZÓ, S.; CSÍK, J.V.; BÁRÁNY, I.; HIDAS, A.; SZÁSZ, F.JR.; BOROS, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. *Theriogenology*, v.50, p.223–228, 1998.

HEATH, A.M.; CARSON, R.L.; PUROHIT, R.C.; SARTIN, E.M.; WENZEL, J.G.; WOLFE, D.E. Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.5, p. 507, 2002.

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

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

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU- DE REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds). *Reprod. Dom. Anim.* Academic Press, New York. p. 203-227, 1977.

PASTORE, A.A. Ultra-sonografia na avaliação andrológica de bovinos da raça Nelore. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, p.63, 2008.

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

PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Computer assisted image analyses, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology* v.43, p.105-112, 1995.

PINHO, R. O.; COSTA, D.S.; SIQUEIRA, J.B.; MARTINS L.F.; CHAYA, A.Y.; MIRANDA, N.T.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J. D.; Correlation of Sexual Maturity Stage with Testicular Echotexture in Young Nelore Bulls. *Acta Scientiae Veterinaria* v. 41, p. 1161-1167, 2013.

PINHO, R.O.; COSTA, D. S.; SIQUEIRA, J.B.; CHAYA, A.Y.; MIRANDA, N. T.; MARTINS, L.F ; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Testicular echotexture and seminal quality of young Montana Tropical Compound bulls classified as sound and unsound for breeding. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, p. 1961-1965, 2012.

RASBAND, W.S., 2005. Image J. U. S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>> Accessed at 10/10/13.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the elongate spermatid- Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* v.70, p.635-64, 1984.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds). *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, N.Y. p.1363-1434, 1994.

SILVA, A.E.D.F.; KASTELIC, J.P.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; COOK, R.B. Ultrassonografia de machos Nelore na fase peri-puberal. Rev. Bras. Repr. An. v.21, p.34-36, 1997.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. An Reprod Sci, v. 78, p. 371-399, 2003.

SINGH, J.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. J Reprod Fertil, v.112, p. 19-29, 1998.

SIQUEIRA, L.G.B.; VIANA, J.H.M. Novas tecnologias em diagnóstico por imagem Jornal O Embrião, Soc. Bras. Tecnol. de Bem, 2006.

VARONI, M.S. Avaliação da espermatogênese e da ecotextura testicular do cavalo Pantaneiro. 2014. Dissertação (mestrado em Produção Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.