

**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Henry Daniel Manrique Ayala

**ULTRASSONOGRAFIA TESTICULAR, EM MACHOS
BUBALINOS CRIADOS EM REGIME EXTENSIVO NO ESTADO
DO PARÁ**

**Belém
2011**

Henry Daniel Manrique Ayala

**ULTRASSONOGRAFIA TESTICULAR, EM MACHOS
BUBALINOS CRIADOS EM REGIME EXTENSIVO NO ESTADO
DO PARÁ**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Haroldo F. L. Ribeiro.

**Belém
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

Manrique Ayala, Henry Daniel

Ultrassonografia testicular, em machos bubalinos criados em regime extensivo no Estado do Pará / Henry Daniel Manrique Ayala; orientador, Haroldo F. L. Ribeiro – 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2011.

1. Búfalo – Pará -Reprodução. 2. Ultra-sonografia veterinária - Pará. 3. Testículos. 4. Testosterona. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.293

Henry Daniel Manrique Ayala

**ULTRASSONOGRAFIA TESTICULAR, EM MACHOS
BUBALINOS CRIADOS EM REGIME EXTENSIVO NO ESTADO
DO PARÁ**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA
Presidente

Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS
Membro Titular

Prof. Dr. Willian Gomes Vale
Universidade Federal do Nordeste Paraense - UFOPA
Membro Titular

**Dedico ao meu pai, minha mãe, minha família
e a todas aquelas pessoas que ajudaram
minha formação neste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha saúde e alegria, dando sentido à vida

À médica veterinária MSc. Gabriela Del Mar Pérez Rondón, pela ajuda oferecida no começo do Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro, por me ter dado essa oportunidade de aprendizagem, pelos conhecimentos transmitidos e conselhos. Ainda, à Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva, por compartilhar o conhecimento e pela valiosa ajuda na análise de dados estatísticos.

Ao Prof. Dr. Willian Gomes Vale e ao Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi pela sua participação em este trabalho podendo colaborar e contribuir com seus conhecimentos e experiências nas melhoras

Ao meu amigo e Prof. MSc. Sebastião Tavares Rolim Filho, pelos conselhos, troca de experiências e, também, por me auxiliar no entendimento dos dados estatísticos.

À coordenadora e professora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues, pelos conselhos dados no início do Mestrado.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, pelo apoio logístico. Ainda, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo disponibilizada; à Unidade Experimental de Bubalinocultura Leiteira “Eva Daher Abufaiad”, pela disponibilidade de animais e ao Centro Nacional de Primatas (CENP), pela ajuda nas análises das amostras de testosterona.

Ao Governo brasileiro e Governo venezuelano, por existirem acordos culturais que ajudam no crescimento científico dos dois países, permitindo que pessoas de outros países possam fazer uso dos acordos.

Aos bolsistas de Iniciação Científica, Andersom, Lusandro, Marcelo, Guto, Victor, Álvaro; aos estagiários e estagiárias, Poliana, Keite, pela ajuda durante o trabalho de campo.

A todos os meus colegas de Mestrado, Silvia (“Maria”), Alex, Juliane, Stefânia, Josy, Bruno, Kim, pelos conselhos, ensinamentos e momentos de confraternização.

A meus amigos e amigas Onel, Renato, Júnior, Pablo, Juliano, Bethy, pelos fins de semana de churrasco.

A Samuel e Robert, *la parte venezolana em Brasil*.

Ao colega Bruno, mestrando da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), por me receber e ajudar durante minha estadia em Campo Grande.

A toda minha família, pelo apoio recebido durante este período, especialmente, meus pais, Henry e Magally e minhas irmãs, Carola, Marylly e Maryany.

A minha namorada, Lidiana, pessoa que amo e que cada dia me ensina com sua paciência e jeito brasileiro.

E a todos aqueles que de uma ou outra forma participaram de minha formação durante o Mestrado.

“O Homem deve criar as oportunidades
e não somente encontrá-las”
FRANCIS BACON

RESUMO

O objetivo foi verificar pela ultrassonografia associada à biometria testicular como ferramenta na seleção de precocidade sexual em machos bubalinos. Foram usados 19 machos mestiços das raças Murrah e Mediterrâneo, com idades entre 11 a 59 meses, no período de 06 de maio a 18 de novembro de 2010. Os animais foram divididos em 12 faixas etárias: 8 animais de 12 a 19 meses; 3 animais de 20 a 29 meses; e 8 animais de 30 a 59 meses. Os animais foram mantidos em sistema extensivo, em área de várzea com pastagem de canarana (*Eriochloa SP*) sem mineralização. Os animais foram submetidos a exame clínico andrológico, com colheita de sêmen por massagem transretal das ampolas e análises físicas do ejaculado. Os exames ultrassonográficos foram realizados com o aparelho modelo Mindray DP-2200, com transdutor linear transretal 75L50EAV, multi-frequencial de 5,0/7,5/10,0 MHz. A ecodensidade testicular (ECO_t) foi expressa em quantidade de pixels/área, utilizando o Programa *Image J*. Foram coletadas amostras sanguíneas para aferição dos níveis de testosterona. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa estatístico SAS 1999. Os resultados da circunferência escrotal mostram médias e desvios padrão mínimo e máximo de 12.88±0.51cm para animais de 12 e 13 meses e de 28.38±0.38cm nos machos com idade maior ou igual a 60 meses, respectivamente. As medidas de volume testicular apresentaram valores mínimo e máximo de 30.28±17.37cm³ em animais de 12 e 13 meses e de 534.25±25.36 cm³ nos animais maiores ou iguais a 60 meses, respectivamente. As médias e desvio padrão da concentração espermática mínima e máxima encontrada foram de 5.5± 3.5(x 10⁶ /mm³) para os animais de 16 e 17 meses e de 51.41± 26.02 (x 10⁶ /mm³) para os maiores ou iguais a 60 meses, respectivamente. Na motilidade espermática as porcentagens mínima e máxima obtidas foram de 10% para animais com 16 e 17 meses e de 80±5.77% para maiores ou iguais a 60 meses, respectivamente. Os defeitos espermáticos totais mínimos e máximos encontrados foram de 18.5 % nos animais de 16 e 17 meses e 3%. Nos maiores ou iguais a 60 meses, respectivamente. Os níveis de testosterona mínimos e máximos encontrados foram de 0.070±0.026 ng/ml para 12 e 13 meses e de 2.762± 0.457 ng/ml para os animais maiores ou iguais a 60 meses, respectivamente. A ecogenicidade para animais na faixa etária de 12 a 13 meses foi de 78.67±6.36 pixel, na faixa de 14 e 15 meses foi de 94.22±3.40 pixel, para os animais com idades de 16 e 17 meses foi de 88.16±3.95 pixel, nos animais entre 18 a 19 meses foi de 96.09±3.40 pixel, para os animais de 20 e 21 meses foi de 103.12±3.86 pixel, para 22 e 23 meses foi de 98.4±5.87 pixel, para a idade de 24 aos 29 meses foi de 114.05±2.42 pixel, na faixa etária de 30 aos 35 meses foi de 109.24±3.13 pixel, para animais de 36 aos 41 meses foi de 98.67±3.05 pixel, entre 42 a 47 meses a média foi 99.33±2.01 pixel, entre 48 a 59 meses foi de 96.17±1.90 pixel e nos animais maiores ou iguais a 60 meses de idade foi de 90.13±1.77 pixel. Concluímos, assim, que a ultrassonografia, pela interpretação da ecogenicidade, associada ao exame clínico andrológico, é uma ferramenta que pode ser usada na seleção de precocidade e avaliação de fertilidade de machos bubalinos.

Palavras-chave: Búfalos. Ultrassonografia. Circunferência escrotal. Volume testicular. Testosterona.

ABSTRACT

The objective was to verify the biometrics associated with testicular ultrasound as a tool in the selection of sexual precocity in male buffalo. We used 19 male crossbred Murrah and Mediterranean breeds, aged between 11 and 59 months, from May 6 to November 18, 2010. The animals were divided into 12 age groups: 8 animals from 12 to 19 months, 3 animals from 20 to 29 months, and 8 animals from 30 to 59 months. The animals were kept under extensive system in the low land to pasture canarana (*Eriochloa* SP) without mineralization. The animals were subjected to clinical andrological examination with semen collection by transrectal massage of the ampoules and physical analysis of the ejaculate. The sonographic examinations were performed with the device model Mindray DP-2200, 75L50EAV transrectal linear transducer, multi-frequency 5.0 / 7.5 / 10.0 MHz echodensity. The testicular (Ecot) was expressed in number of pixels / area, using the program Image J. We collected blood samples to measure testosterone levels. Statistical analysis was performed using the SAS statistical software 1999. The results of scrotal circumference show averages and standard deviations minimum and maximum of 12.88 ± 0.51 cm for animals of 12 and 13 months and 28.38 ± 0.38 cm in males aged greater than or equal to 60 months, respectively. The testicular volume measurements showed minimum and maximum values of 30.28 ± 17.37 cm³ in animals of 12 and 13 months and 534.25 ± 25.36 cm³ in animals greater than or equal to 60 months, respectively. The mean and standard deviation of the sperm concentration maximum and minimum found were 5.5 ± 3.5 ($\times 10^6$ / mm³) for animals of 16 and 17 months and 51.41 ± 2.26 ($\times 10^6$ / mm³) for greater than or equal to 60 months, respectively. Sperm motility in the minimum and maximum percentages were obtained 10% for animals with 16 and 17 months and $80 \pm 5.77\%$ to greater than or equal to 60 months, respectively. The total sperm defects found were minimum and maximum of 18.5% in animals of 16 and 17 months and 3% in greater than or equal to 60 months, respectively. Testosterone levels were found minimum and maximum of $0,070 \pm 0,026$ ng / ml for 12 and 13 months and 2762 ± 0457 ng / ml for animals greater than or equal to 60 months, respectively. The echogenicity for animals aged 12 to 13 months was 78.67 ± 6.36 pixels, in the range of 14 and 15 months was 94.22 ± 3.40 pixels, for animals aged 16 and 17 months was 88.16 ± 3.95 pixels, animals between 18 and 19 months was 96.09 ± 3.40 pixels, for animals of 20 and 21 months was 103.12 ± 3.86 pixels, for 22 and 23 months was 98.4 ± 5.87 pixels, for the age of 24 to 29 months was 114.05 ± 2.42 of pixels, aged 30 to 35 months was 109.24 ± 3.13 pixel for animals of 36 at 41 months was 98.67 ± 5.3 pixel, between 42 to 47 months the average was 99.33 ± 2.1 pixel, between 48 to 59 months was 96.17 ± 1.90 pixel and animals greater than or equal to 60 months of age was 90.13 ± 1.77 pixel. We conclude that ultrasonography, the interpretation of the echogenicity, associated with the clinical andrological examination, is a tool that can be used in the selection of precocity and fertility evaluation of male buffalo.

Keywords: Buffalo. Ultrasonography. Scrotal circumference. Testicular volume. Testosterone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Idades a puberdade e maturidade sexual de búfalos de diferentes raças, local de criação e manejo.	18
Imagem 1 – Local do experimento na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).	27
Mapa 1 – Localização da cidade de Belém no estado do Pará.	27
Quadro 2 – Número de animais, tempo de coleta, idades inicial e final dos animais, animais agrupados em faixas etárias.	28
Imagem 2 – Local onde foram mantidos os animais do experimento na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).	29
Fotografia 1 – Área de várzea onde eram mantidos os animais do experimento na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).	29
Fotografia 2 – Aferição do comprimento testicular com uso do paquímetro	30
Fotografia 3 – Aferição da circunferência escrotal com uso de fita métrica.	30
Fotografia 4 – Massagem transretal das ampolas e coleta de sêmen.	31
Fotografia 5 – Material utilizado para a avaliação qualitativa do sêmen.	31
Fotografia 6 – Aparelho ultrassonográfico com transdutor transretal.	32
Fotografia 7 – Posicionamento do transdutor nos testículos para obtenção das imagens.	32
Imagem 3 – Imagem ecográfica longitudinal-lateral do parênquima testicular de um bubalino aos 18 meses de idade.	33
Imagem 4 – Imagem ecográfica transverso-lateral do parênquima testicular de um bubalino aos 18 meses de idade.	33
Fotografia 8 – Amostras de soro sanguíneo.	34
Fotografia 9 – Processamento das amostras de soro sanguíneo.	34
Fotografia 10 – Analisador automático <i>Elecsys</i> 2010 (Roche® Diagnostics).	34
Gráfico 01 – Desenvolvimento testicular de circunferência escrotal (cm) e volume testicular (cm ³) de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária.	39

Gráfico 02 – Comparativo entre as médias de concentração, motilidade e defeitos totais espermáticos de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.	40
Imagem 5.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 12 meses de idade. Região de baixa intensidade ecográfica demarcada por setas. Mediastino testicular delimitado por linhas.	44
Imagem 5.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 12 meses de idade. Região de baixa intensidade ecográfica demarcada por setas. Mediastino delimitado por círculo.	44
Imagem 6.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 14 meses de idade. Parênquima testicular com proporção maior de ecogenicidade e de intensidade média. Mediastino testicular (setas).	44
Imagem 6.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 14 meses de idade. Mediastino testicular (setas).	44
Imagem 7.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 16 meses de idade. Parênquima testicular com ecogenicidade de intensidade média. Mediastino testicular (setas).	45
Imagem 7.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 16 meses de idade. Parênquima testicular (setas). Mediastino testicular (círculo).	45
Imagem 8.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 18 meses de idade. Mediastino testicular em linha hiperecoica (setas).	45
Imagem 8.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 18 meses de idade. Região do parênquima testicular com ecogenicidade média (setas). Mediastino (círculo).	45
Imagem 9.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 20 meses de idade. Mediastino bem delimitado (setas).	46
Imagem 9.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 20 meses de idade. Região do parênquima testicular com intensidade baixa (setas).	46
Imagem 10.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 22 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica fina (setas).	46
Imagem 10.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 22 meses de idade. Mediastino testicular (setas).	46
Imagem 11.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 24 meses de idade. Região de ecogenicidade média (setas). Mediastino (linha horizontal com setas).	47

Imagem 11.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 24 meses de idade. Mediastino (círculo).	47
Imagem 12.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 33 meses de idade. Parênquima com ecogenicidade homogênea. Mediastino que divide parênquima testicular (setas).	47
Imagem 12.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 33 meses de idade. Mediastino (círculo).	47
Imagem 13.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 36 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica (setas) que divide o parênquima.	48
Imagem 13.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 36 meses de idade. Mediastino em ponto hiperecoico (círculo).	48
Imagem 14.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 48 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica fina que divide o parênquima testicular (setas).	48
Imagem 14.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 48 meses de idade. Mediastino em ponto hiperecoico central (círculo).	48
Imagem 15.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 60 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica fina (setas) que divide o parênquima.	49
Imagem 15.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 60 meses de idade. Mediastino em ponto hiperecoico central (círculo).	49
Gráfico 03 – Relação entre centímetros de circunferência escrotal, ECOT e níveis ng/ml de testosterona de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.	53
Gráfico 04 – Relação entre circunferência escrotal, volume testicular e a quantidade de pixels de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Circunferência escrotal e Volume testicular (média e desvio padrão) de machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) (n=19) de acordo com a faixa etária, avaliados num período de 6 meses consecutivos mantidos a pasto na Amazônia Oriental.	37
Tabela 2 – Médias, desvio padrão, frequência, valores mínimos e máximos de níveis de testosterona de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.	42
Tabela 3 – Intensidade Ecográfica testicular em pixels (média e desvio padrão, valores mínimos e máximos) (n=19) de machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de 6 meses na Amazônia Oriental.	50
Tabela 4 – Coeficiente de correlação entre os parâmetros de idade, biometria testicular e ecodensidade testicular de machos bubalinos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de 12 a 60 meses, no período de maio a novembro 2010.	53

...

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 GERAL	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL	17
3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA ANDROLÓGICA	18
3.2.1 Biometria testicular	18
3.2.2 Sêmen bubalino	21
3.3 TESTOSTERONA	22
3.4 ULTRASSONOGRAFIA	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	27
4.2 ANIMAIS DO EXPERIMENTO	27
4.3 EXAME CLÍNICO GERAL E BIOMETRIA TESTICULAR	29
4.4 COLHEITA E ANÁLISES DO EJACULADO	30
4.5 EXAME ULTRASONOGRÁFICO E ANÁLISES DAS IMAGENS	31
4.6 COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISE DE TESTOSTERONA	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 BIOMETRIA TESTICULAR	36
5.2 COLETAS E ANALISE DE SÊMEN	39
5.3 TESTOSTERONA	42
5.4 ECOGENICIDADE	43
5.5 CORRELAÇÕES	52
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a grande demanda da classe produtora de búfalos de todo o país é por animais superiores, provados e/ou testados, para a produção de carne e leite. Zava (1984) assinala que a pecuária bubalina vinha sendo praticada em todas as regiões brasileiras, apresentando excelente desempenho, no qual os produtos diferenciados já eram o ponto alto da exploração. Na Amazônia, particularmente no estado do Pará, contudo, vários fatores, destacando-se a falta de programas sanitários, reprodutivos e o manejo inadequado na grande maioria das propriedades, fazem com que a pecuária bubalina ainda não apresente bons rendimentos.

A falta desses conhecimentos sobre machos bubalinos no que se refere à fisiologia reprodutiva faz com que a seleção de reprodutores se faça a partir de características fenotípicas que pouco ou nada têm a contribuir para a melhoria da produtividade do rebanho bubalino.

Alem disso na bubalinocultura, a seleção de reprodutores e coleta de sêmen para a disseminação de material genético de boa qualidade é quase sempre difícil, pela insuficiência de dados relacionados aos aspectos reprodutivos como indicadores de fertilidade tais como biometria e volume testicular, idade a puberdade, maturidade sexual e libido. A estação do ano com seus inúmeros fatores, como foto-período, temperatura, umidade relativa, disponibilidade de alimento, influenciam o sistema endócrino provocando alterações na atividade sexual do macho e consequentemente na qualidade do sêmen o que reflete na fertilidade do touro bubalino.

Para que exista expansão e maior produtividade do rebanho bubalino, é preciso conhecer geneticamente essas características associadas à eficiência reprodutiva dos machos para identificar os animais, mais aptos à reprodução, e que possuam genética superior para as características reprodutivas.

Os autores Ribeiro e Vale (2007); Vale et al. (2008) relatam que em alguns rebanhos brasileiro, como também de outros países da América Latina, os problemas relacionados em que se encontram algumas linhagens, especialmente as denominadas POI (Pura de Origem Importada), tendo em vista o reduzido número de animais que deram origem a algumas raças e rebanhos bubalinos, possivelmente ocorrendo alta consanguinidade.

Para fins dos anos oitenta a ultrassonografia já demonstrava ser uma ferramenta no diagnostico por imagem de grande importância na avaliação dos eventos fisiológicos e

patológicos. Moura e Merkt (1996) acreditam que a ultrassonografia é um recurso e técnica complementar ao exame clínico. É extremamente prática e fornece ao médico veterinário informações concretas do estado reprodutivo do rebanho, favorecendo a solução de problemas de infertilidade por meio de decisões rápidas e tratamentos mais adequados. Afirmam, também, que este recurso estabeleceu uma nova dimensão para a reprodução animal em todos seus aspectos anato-fisiopatológicos.

Atualmente a ultrassonografia é considerada (Hildebrandt et al. 2000), uma abordagem básica para a exploração não-invasiva da anatomia e da fisiologia reprodutiva dos animais. Isto não só tem melhorado a aceitação da biotecnologia aplicada na comunidade científica, mas também o valor agregado pela melhoria de bem-estar animal. Igualmente, alterações na ecotextura que se assemelham a condições patológicas que afetam a fertilidade podem ser monitoradas por exames ultrassonográficos permitindo mapear essas alterações ocorridas e acompanhar a evolução das seqüelas.

Portanto o presente estudo considera que avaliações do parênquima testicular por ultrassonografia poderão fornecer informações úteis sobre parâmetros a serem utilizados na seleção de machos bubalinos destinados a reprodução com melhor padrão.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Verificar a ultrassonografia associada à biometria testicular como ferramenta na seleção de precocidade sexual em machos bubalinos criados no estado do Pará.

2.2 ESPECÍFICOS

- Correlacionar as modificações na ecotextura testicular ultrassonográfica com a idade e a circunferência escrotal de búfalos na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual, em criações extensivas.
- Correlacionar as modificações na ecotextura testicular ultrassonográfica com a idade e o volume testicular de búfalos na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual, em criações extensivas.
- Comparar as modificações na ecotextura testicular ultrassonográfica de búfalos na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual com as características no ejaculado.
- Comparar o perfil da testosterona e a modificações na ecotextura testicular ultrassonográfica de búfalos na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL

Ohashi, Sousa e Vale (1988) e Vale Filho (2001) consideraram que a puberdade é o período que se estende do início da ativação da gametogênese até sua implantação e passa por fases distintas desde o início da presença de espermatozóides no ejaculado até a condição plena de fecundação do sêmen. Os mesmos autores também afirmam que o macho bubalino quando comparado ao bovino taurino ou zebuíno possui uma precocidade atrasada no que se refere à reprodução. Para Koonjaenak (2006), a puberdade está relacionada com a idade do touro e fatores ambientais, incluindo a disponibilidade e ingestão de alimentos.

A puberdade no búfalo, de acordo com Vale et. al. (2008), pode ser como o tempo no qual o animal inicia a produção de espermatozóides férteis e apresenta a libido, com capacidade para montar uma fêmea em cio e fertilizar um óvulo.

O Quadro 1 mostra uma revisão da literatura da idade a puberdade e a maturidade sexual de diferentes raças, evidenciando uma variação de acordo com o País, local de criação e o manejo.

Autor	Raça	Idade a puberdade	Idade a maturidade	Local
Ohashi, Sousa e Vale (1988)	Murrah,	8-9 meses	18 a 24 meses	Brasil
Mccool e Entwistle (1989)	Carabau	24 meses		Austrália
Melo (1991)	Mestiços (Murrah X Mediterraneo)	16 meses		Brasil
Ohashi (1993)	Mestiços (Murrah X Mediterraneo)	12-14 meses	27 meses	Brasil
Melo e Vale Filho (1993)	Mestiços (Murrah X Mediterraneo)	18-24 meses		Brasil
Vale et al. (2001)	Murrah		30-36 meses	Brasil (Amazônia)
Vale et al. (2002)	Murrah	12 meses		Brasil
Ribeiro (2006)	Murrah	< de 15 meses	20 meses	Brasil (Amazônia rebanho bem manejado)
Ribeiro (2006)	Murrah	13 meses	18 meses	Brasil (Amazônia Rebanho de elite)
Ribeiro (2006)	Murrah	24 a 36 meses		Brasil (Amazônia criações extensivas)
Koonjaenak (2006)	Carabau		3 e 4 anos	Thailândia
Ahmad et al. (2010)	Nili-Ravi	22,8 meses		Pakistão

Quadro 1 – Idades a puberdade e maturidade sexual de bufalos de diferentes raças, local de criação e manejo.

3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA ANDROLÓGICA

3.2.1 Biometria testicular

Segundo Brass et al. (1989), o exame morfológico dos órgãos genitais do macho era realizado basicamente por meio de inspeção e palpação e para realizar a avaliação da capacidade reprodutiva deveriam ser utilizados critérios da biometria e consistência testicular, além dos parâmetros espermáticos. O conhecimento dos parâmetros biométricos normais do testículo de uma espécie, tais como a circunferência escrotal, largura, comprimento e o volume são de fundamental importância. Como demonstrado por Fields, Burns e Warnick (1979), que usaram

uma fórmula matemática para formato longos a longos/ovais para determinar os efeitos da raça e temperatura ambiental sobre o volume testicular e características de sêmen de touros bovinos de diferentes raças.

Segundo Ohashi (1993) e Brito et al. (2004), entre os dados da biometria testicular, a circunferência escrotal (CE) é um dos mais utilizados por ser de fácil aferição e apresentar alta correlação com o peso corporal e com a capacidade reprodutiva do animal, especialmente com a produção espermática.

Vale et al. (1978, 2001, 2004); Sousa et al. (1980) evidenciaram que o trato genital do macho bubalino é semelhante morfológicamente ao do bovino, entretanto são menores. Os estudos de Coulter, Larson e Foote (1975); Carter, Wood e wright (1980); Ahmad et al. (1984); Ohashi (1993); Aguiar (1993); Vale et al. (2001, 2004); Vale (2006) verificaram que as medidas de peso, largura e espessura para o testículo direito e esquerdo apresentam alta correlação com o desenvolvimento corporal e circunferência escrotal, bem como, uma correlação positiva entre idade e peso corporal. Segundo os autores, são dois parâmetros importantes utilizados na avaliação da capacidade reprodutiva tanto do macho bovino como dos bubalinos.

Em um trabalho independentemente sobre raças Jafarabadi e Murrah, publicado por Villares, Ramos e Rocha (1979), foram encontradas medidas de circunferência escrotal para animais com menos de sete meses de 10,5cm e de 60 meses ou mais de 35,2cm, observando maior incremento de crescimento linear nas idades pré e peri-púbere, entre 7 e 17 meses. Os autores não evidenciaram diferenças da circunferência escrotal entre as raças de búfalos, em nenhuma idade na faixa etária de menos de sete e maior de 60 meses.

Perímetros escrotais e volume testicular em 65 touros búfalos de pântano entre 7 a 60 meses de idade foram mensurados por Bongso, Hassan e Nordin (1984), verificando que o tamanho testicular apresentou-se muito menor quando comparado ao gado doméstico. Mccool e Entwistle (1989) verificaram baixa a circunferência escrotal (16 cm) em búfalos do pântano aos 24 meses de idade.

No estudo da atividade espermatogênica feito por Melo (1991) em búfalos, o autor verificou que atividade espermatogênica aumentou de maneira acelerada até 18-24 meses e estabilizou, indicando que a partir de 24 meses de idade os animais já se encontravam aptos para dar início à atividade reprodutiva, embora não tivessem atingido o seu pleno desenvolvimento testicular reprodutivo.

Os trabalhos de Ohashi (1993) e Ohashi et al. (2007) com mestiços Murrah x Mediterrâneo mostraram que as médias de perímetros escrotais foram de 12,6cm em animais com 2 a 5 meses; 14,1cm com 6 a 8 meses; 19,3cm com 9 a 11 meses; 23,7cm com 13 a 14 meses; 24,4cm para 16 meses; 28,2cm com 18 a 24m e 32,7cm para maiores de 36 meses.

Segundo Bhosrekar (1993), a circunferência escrotal para búfalos adultos indianos, com mais de cinco anos de idade, varia entre 30 a 34 cm, estando esse fato diretamente relacionado ao manejo e à alimentação.

A circunferência escrotal ideal, segundo Vale et al. (2001, 2004), para touros da raça Murrah entre 30-36 meses de idade está em torno de 27 a 33 cm, havendo um crescimento linear e correlacionado entre a circunferência escrotal, o peso corporal e a idade do animal..

Em mensurações testiculares de 70 búfalos mestiços Murrah x Jafarabadi realizadas por Pacheco et al. (2005) em animais de 12, 18 e 24 meses de idade, as médias de CE foram de $15,00 \pm 2,16$ cm; $21,24 \pm 1,66$ cm; $26,85 \pm 1,84$, cm respectivamente. No mesmo trabalho, os autores mensuraram animais de 12 18 e 24 meses observaram volume testicular médio de $244,45 \pm 91,70$; $598,60 \pm 191,04$; $1162,68 \pm 503,03$ respectivamente.

A circunferência escrotal (CE) em machos da raça Murrah, de acordo com Vale et al. (2008), foi de 21 ± 3.3 cm entre 12 a 17 meses; 25 ± 3.2 cm de 18 a 23 meses; 27 ± 2.8 cm de 24 a 29 meses; 29 ± 3.5 cm de 30 a 35 meses; 32 ± 3.1 cm de 36 aos 41 meses; 34 ± 2.9 cm dos 42 aos 47 meses; 36 ± 3.5 cm de 48 aos 53 meses e 38 ± 3.6 cm para animais de 54 a 60 ou mais meses de idade.

Barbosa (2009), examinando 305 machos bubalinos criados em sistema intensivo, com idade média de $2,27 \pm 0,44$ anos e de $5,15 \pm 0,51$ anos, encontrou circunferência escrotal de $25,89 \pm 2,93$ cm e de $30,92 \pm 2,77$ cm, respectivamente. Em sistemas extensivos, o mesmo autor verificou que em animais com idade média de $2,28 \pm 0,47$ anos, a circunferência escrotal foi de $20,11 \pm 3,30$ cm e que em machos com idade média de $7,3 \pm 2,05$ anos, a circunferência era de $28,05 \pm 2,55$ cm. Confirmou, assim, que as maiores circunferências foram nos touros de criações intensivas.

Ahmad et al. (2010) estudando o desenvolvimento testicular de touros Nili-Ravi, observaram que machos com idade de 1 mês apresentavam uma circunferencia escrotal de 9 cm; com 6 meses, de 14 cm; com 12 meses, 20cm; com 18 meses, 23 cm e animais com 24 meses apresentavam circunferencia escrotal de 25 cm.

3.2.2 Sêmen bubalino

Para Barnabe (1999), os padrões mínimos para a classificação de uma amostra provavelmente fértil de sêmen de búfalo são 500 milhões de espermatozóides por ml, mais de 60% de espermatozóides móveis com progressão retilínea e mais de 70% de espermatozóides com morfologia normal. Um ejaculado bubalino de boa qualidade, segundo Vale et al. (2002), deve apresentar volume que pode variar de 1,0 a mais de 3,0 ml, concentração espermática de 600 a 1.200 milhões de espermatozóides por ml, turbilhonamento mínimo de 3 (escala 0 a 5), motilidade espermática entre 60 e 80% e vigor de pelo menos 3 (escala de 0 a 5).

As características físicas do sêmen de bubalinos, de acordo com Gill, Gangwar e Takkar (1974); Chaudhary e Gangwar (1977); ElWishi (1976); Singh e Shady (1978); Rajamahendran (1982); Bhavsar, Dhaml e Kodagali (1986); Bhosrekar, Purohit e Pande (1998); Ganguli (1988), sofrem mudanças dependendo da estação do ano. Conforme os autores, durante o período chuvoso, o sêmen apresenta-se com melhor qualidade e diminui no período seco.

Bhattacharya (1978) destacou que esta influência é considerada uma das razões por que o búfalo é considerado por muitos autores um animal sazonal. Em regiões tropicais como a Amazônia, de acordo com Ohashi, Sousa e Vale (1988), a qualidade do sêmen é boa durante a estação chuvosa, entre janeiro e julho. Segundo os autores, é o melhor período para colheita e congelamento de sêmen.

Avaliações seminais em touros Murrah feitas por Vale (1994, 1997) mostraram-se melhores no período chuvoso. Também Sousa et al. (1998) avaliaram as características físicas do sêmen de búfalos Murrah e Mediterrâneo na região amazônica e demonstraram que os animais Mediterrâneo tiveram variação apenas do volume seminal entre as estações, revelando-se maior no período chuvoso.

Jainudeen e Hafez (2004) consideram que no búfalo o ejaculado normal apresenta uma coloração branco-leitoso a acinzentado, raramente ultrapassa 5 ml e possui uma concentração espermática entre 300 e 1.500 milhões de células por ml.

No trabalho de Ohashi et al. (2007) com búfalos mestiços foi observado que atividade espermática dos testículos seguindo a classificação clínico-reprodutiva dos animais baseada na atividade gametogênica dos testículos, apresentou não apenas correlação positiva com a idade

($r=0,72$) e com a CE ($r=0,89$), mas também, indicou aumento linear em relação à idade ($r^2=86\%$) e à CE ($r^2=83\%$).

O quadro seminal normal de um búfalo adulto maior que 30 meses de idade, descrito por Vale et al. (2008), mostrou cor branco a branco leitoso, com estrias escuras azuladas; volume de 2 a 8 ml, com média de 3 ml; turbilhonamento e vigor com escala de 1 a 5, com aceitabilidade maior que três; motilidade espermática acima de 70%; concentração espermática entre $0,6 \times 10^6$ a $1,2 \times 10^6$ /ml e patologias espermáticas aceitáveis abaixo de 30%, com ph moderadamente neutro. Os mesmos autores assinalam que é importante correlacionar as características fenotípicas do animal com o quadro seminal, identificando por acaso a presença de possíveis patologias no sistema genital, bem como os fatores ambientais que porventura interferem na fertilidade do mesmo.

Atualmente, Barbosa (2009), por massagem das ampolas de 305 búfalos, coletou 123 ejaculados de touros criados de forma extensiva. Em animais menores que 4 anos, encontrou volume de $1,971 \pm 1,64$ ml, motilidade de $37 \pm 0,29\%$ e concentração de $0,53 \pm 0,36 \times 10^9$ /ml; em animais maiores de 4 anos, obteve volume de 1ml, motilidade de 40% e concentração de $0,62 \times 10^9$ /ml. Por sua vez, nos machos de criação intensiva com idade menor que 4 anos, o volume encontrado foi de $0,82 \pm 0,54$ ml, a motilidade foi de $31 \pm 0,29\%$ e a concentração de $0,57 \pm 0,54 \times 10^9$ /ml; e em animais maiores que 4 anos o volume obtido foi de 0,25ml, a motilidade de 60% e concentração $0,807 \times 10^9$ /ml.

3.3 TESTOSTERONA

A testosterona é um hormônio esteróide que atua em inúmeras fases do processo reprodutivo do macho, que vai desde a diferenciação sexual até o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Além disso, atua determinando o desejo e o comportamento sexual, controlando também a função dos órgãos reprodutivos e a espermatogênese (OHASHI, 1993).

Em relação aos níveis de testosterona, estudos de Perera et al. (1979) em bubalinos Murrah, avaliados em diferentes épocas do ano, observaram que o nível basal de testosterona ficou abaixo de 0,2 ng/mL e que, comparativamente, os touros bubalinos apresentaram um

décimo da concentração encontrada em plasma sanguíneo de bovino de raças taurinas. Desse modo, concluíram que essa baixa concentração pode estar relacionada com a fraca libido dos touros bubalinos e que o nível de testosterona, bem como a libido, pode variar em função da estação do ano.

Estudando o ciclo circadiano da testosterona em três búfalos de pântano, com idade entre 1,1 a 2 anos de idade, Chantaraprateep et. al. (1981) verificaram que o número de picos varia de 3 a 10 durante o dia.

Estudos dos níveis de testosterona do nascimento até a maturidade sexual, por Sharma et al. (1984), por meio da técnica de RIA, concluíram que o nível de até 450 pg/ml poderia indicar o início da puberdade e, entre 800 a 1000 pg/ml, o nível indicativo de que o animal tenha chegado à maturidade sexual.

O ciclo circadiano de testosterona e o efeito do GnRH sobre a liberação de testosterona pelos testículos foram observados por Gunarajasingam et al. (1985), demonstrando que o número de picos variou de zero a três por dia, com duração de duas a cinco horas e que a resposta testicular ao GnRH foi observada somente a partir dos seis meses de idade, sendo que a mesma aumentou com a idade.

De modo geral, os referidos autores observaram que a concentração de testosterona nos bubalinos é menor do que em outras espécies domésticas e, em parte, causada pela alta temperatura dos trópicos, fato este que pode ser o responsável pela pobre libido, bem como pelo baixo desempenho reprodutivo dos touros bubalinos.

3.4 ULTRASSONOGRAFIA

A transformação de um testículo de animal pré-púbere até a puberdade contendo células de Sertoli e espermatogônias (A) ocorre durante 16-24 semanas de idade. Curtis e Aman (1981), evidenciaram que as unidades de pixel diminuem neste período. O aumento em unidades de pixel a partir das 24 semanas de idade em diante poderia ser atribuído ao início da divisão de espermatogônias e à formação gradual de mais tipos de células maduras durante a espermatogênese.

Durante o período de maturidade sexual, o parênquima testicular ao início sofre modificações no lúmen dos túbulos seminífero. Esta alteração ocorre devido à iniciação da secreção de fluidos. Desse modo, a ultrassonografia permite caracterizar estas alterações testiculares durante o período de maturação sexual (CURTIS; AMAN, 1981).

Avaliações ultrassonográficas de testículos de porcos adultos em condições normais já foram usados com sucesso por Cartee et al. (1986). A imagem ultrassonográfica dos testículos de 20 touros com idades de seis meses até 10 anos com exame andrológico satisfatório, segundo Pechman e Eilts (1987); Cartee et al. (1989), é compatível com o relatado por outros pesquisadores e descreve um parênquima testicular homogêneo e hipocóico, com uma estrutura hiperecótica central que representa o mediastino testicular. As túnicas vaginais, fâscia espermática e escroto são indistinguíveis e apareceram hiperecóticas, cobrindo todo o parênquima. A cauda e a cabeça do epidídimo foram mais hipocóticas que o parênquima testicular, com áreas de anecogenicidade representando os ductos eferentes.

Os mesmos autores concluíram, assim, que o diagnóstico por ultrassom parece ser um instrumento excepcional para avaliar patologias testiculares e escrotais em touros, pois verificaram que a técnica não é invasiva, é de fácil execução, principalmente com uso de scanners portáteis e, potencialmente, oferece informação sobre a estrutura do testículo não disponível por qualquer outro meio. No mesmo sentido, Brass et al. (1989) avaliando ecograficamente alterações do plexo pampiniforme e dos testículos no garanhão, inferiram que a ultrassonografia é um método indolor.

Por sua vez, para ter um melhor resultado na imagem ultrassonográfica testicular, Pugh, Konde e Rark (1990) usaram uma frequência de 5–7,5 MHz, pois baixas frequências não forneciam uma alta qualidade de resolução. Evans et al. (1996), durante um estudo sobre o desenvolvimento sexual em touros de corte, interpretaram avaliações de ecogenicidade dos testículos, concluindo que a ecogenicidade testicular aumentou entre 20 e 40 semanas de idade durante a fase mais ativa de crescimento dos túbulos seminíferos, com mais células germinativas potencialmente maduras.

Em carneiros Suffolk, na análise da imagem obtida por ultrassonografia, Chandolia et al. (1997a), interpretaram que os valores de pixel em contraste com o crescimento testicular mostraram um padrão mais complexo durante o desenvolvimento sexual, refletindo alterações no parênquima testicular, tais como a proliferação celular e a produção de fluido pelo testículo.

Ainda, esses autores observaram que a redução inicial na intensidade de pixel entre o nascimento e 8 semanas de idade provavelmente reflete a produção de líquido nos testículos comumente vista antes do início da espermatogênese e que, por sua vez, o aumento nos valores numéricos de pixel entre 8 e 22 semanas de idade poderia ter sido devido à formação gradual dos tipos de célula mais madura da espermatogênese.

Grande parte do aumento na intensidade de pixel, entre 8 e 22 semanas de idade, ocorreu num contexto de elevação, de altas concentrações séricas de testosterona, sendo que depois de estabelecida a espermatogênese a intensidade de pixel estagnaram (CHANDOLIA et al., 1997a).

Chandolia et al. (1997b), com o uso de ultrassonografia testicular a cada 2 semanas, em bezerros de 2 a 46 semanas de idade, identificaram pela ecogenicidade o momento em que os animais atingiram a puberdade, isto é, o momento em que os testículos atingiram uma circunferência escrotal de 28cm.

A alta correlação com a área dos túbulos seminíferos, encontrada por Gabor et al. (1998) avaliando a ecotextura do testículo, indicou que a ultrassonografia do testículo tem um potencial considerável para a avaliação da função testicular no touro.

O aumento inicial em unidades de pixel no parênquima testicular de bovinos entre o nascimento e 14 ou 16 semanas de idade, segundo Aravindakshan et al. (2000), provavelmente reflete a proliferação celular, enquanto que a diminuição nas unidades de pixel nos animais de 14 ou 16 semanas de idade poderia ser explicada pelo aumento significativo no volume dos túbulos seminíferos e por um aumento da proporção de líquido no tecido, iniciada em torno deste período em bezerros bovinos.

Brito et al. (2004) descobriram aumento da intensidade de pixel correlacionado com o perímetro escrotal de animais diferentes idades, fato que se deve a maturação do parênquima e indica a multiplicação das células germinativas. Por outro lado, a diminuição da intensidade de pixel, indica uma ampliação do diâmetro dos túbulos e início da produção espermática na imagem ultrassonográfica.

No estudo de insulação escrotal em bovinos feito por Arteaga, Barth e Brito (2005), a intensidade de pixel testiculares representou a melhor associação com a qualidade do sêmen futuro, quando comparada com a qualidade do sêmen presente. Conforme os autores, foi um melhor indicador da qualidade seminal insatisfatória do que satisfatória.

Abdel-razek e Ali (2005) avaliaram bovinos desde o nascimento até 2 anos e três meses de idade, encontraram imagens longitudinais de testículo que mostraram moderada ecogenicidade do parênquima testicular. O mediastino apareceu como uma linha hiperecogênica no meio, permitindo uma avaliação não-invasiva da estrutura interna do escroto e dos testículos, bem como de sua túnica fibrosa, parênquima e mediastino. Ao mesmo tempo, os autores acompanharam as mudanças da estrutura interna do escroto e testículo durante o seu desenvolvimento, atribuindo-as à proliferação celular e produção de fluidos.

Pela ultrassonografia Chapwanya et al. (2008) examinaram o parênquima testicular de touros de diferentes raças, com idades de dois a nove anos e destes sete mostraram parênquima anormal. Neste estudo, os autores encontraram lesões testiculares palpáveis e não palpáveis identificadas pela ultrassonografia, indicando que a ecografia testicular é uma modalidade diagnóstica mais sensível e confiável do que o exame feito por palpação.

Cardilli et al. (2009a, 2009b) avaliaram o padrão ultrassonográfico do parênquima testicular de 111 bovinos nelore dos nove aos 15 meses de idade e apenas três permaneceram alterados. Importa observar que estes testículos não tinham alterações visíveis no tamanho, forma, posição, simetria, mobilidade, consistência e sensibilidade. Apenas por meio da ultrassonografia foi possível constatar as alterações no parênquima testicular dos três animais do grupo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

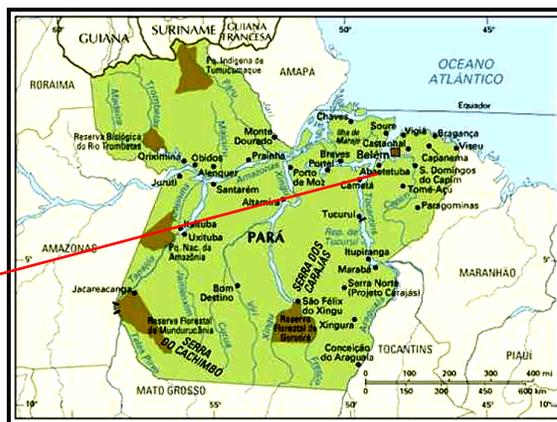
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O estudo foi realizado no *Campus* da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) (Imagem 1) com animais da Unidade Experimental de Bubalinocultura Leiteira “Eva Daher Abufaiad em Belém do Pará, Brasil (Mapa 1), situado entre a latitude 01° 27' 21", longitude 48° 30' 16" e altitude 10 metros. A região apresenta temperatura média anual de 26,4°C, umidade relativa do ar média de 84%, insolação anual de 2338,3 horas/ano, chuvas e tipo climático local classificados como Af_i (BASTOS et al., 2002).



Imagem 1 – Local do experimento na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

Fonte: Google Earth (2011).



Mapa 1 – Localização da cidade de Belém no estado do Pará.

Fonte: Belém... (2011).

4.2 ANIMAIS DO EXPERIMENTO

Utilizou-se dezenove machos bubalinos mestiços das raças Murrah e Mediterrâneo, com idade inicial entre 11 a 59 meses. O período do experimento teve início no dia 06 de maio de 2010, finalizando-se no dia 18 de novembro de 2010. As coletas dos animais com idades iniciais

desde 30 meses até idade final maior 60 meses foram finalizadas no dia 07 de outubro de 2010. Para a análise estatística os animais foram agrupados em classes de faixa etária (FXET) conforme Quadro 2.

Animal nº	Tempo de coleta	Coletas		Idades em meses por categorias de faixas etárias	
		Idade inicial (meses)	Idade final (meses)	Faixa etária (meses)	Idades incluídas em meses
1	6 meses, 12d	11m, 17d	17m, 29d	12	12 e 13
2		12m, 21d	19m, 2d	14	14 e 15
3		13m, 7d	19m, 19d	16	16 e 17
4		13m, 9d	19m, 21d	18	18 e 19
5		13 m, 26d	20m, 8d	20	20 e 21
6		14 m, 4d	20m, 16d	22	22 e 23
7		14 m, 19d	21m	24	24 a 29
8		15 m, 2d	21m, 14d	30	30 a 35
9		21m	27m, 12d	36	36 a 41
10		26 m, 19d	33m	42	42 a 47
11		26 m, 22d	33m, 3d	48	48 a 59
12	5 meses	30 m, 25d	35m, 25d	60	≥ a 60
13		32 m, 14d	37m, 14d		
14		33 m, 16d	38m, 16d		
15		39 m, 13d	44m, 13d		
16		43 m, 4d	48m, 4d		
17		46 m, 15d	51m, 15d		
18		57 m, 5d	62m, 5d		
19		59 m, 5d	64m, 5d		

Quadro 2 – Número de animais, tempo de coleta, idades inicial e final dos animais, animais agrupados em faixas etárias.

Os animais foram mantidos em sistema extensivo, em área de várzea (Imagem 2) com pastagem de canarana (*Eriochloa sp*) e não eram suplementados de forma contínua, nem recebiam sal mineral (Fotografia 1). Os animais foram vacinados contra febre aftosa, clostridioses, desvermifugados e submetidos a testes de tuberculose anualmente. Os animais foram submetidos a coletas sequenciais quinzenais por um período de seis meses. A cada coleta registrou-se: Biometria testicular, imagem testicular ultrassonográfica, coletas seminais e análise dos aspectos físicos do sêmen. Também foram coletadas amostras sanguíneas para aferir os níveis de testosterona.



Imagem 2 – Local onde foram mantidos os animais do experimento na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

Fonte: Google Earth (2011).



Fotografia 1 – Área de várzea onde eram mantidos os animais do experimento na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

4.3 EXAME CLÍNICO GERAL E BIOMETRIA TESTICULAR

Os animais foram submetidos a exame clínico geral segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY; NEVES,1998). A biometria testicular foi realizada utilizando-se um paquímetro (Fotografia 2) para a obtenção das medidas de comprimento (C) do ápice à base de cada testículo, desconsiderando a cauda do epidídimo, e de largura (L) no sentido latero-medial da região mediana de cada testículo, a fim de obter o volume testicular de acordo com o sugerido por Fields, Burns e Warnick (1979), para testículos de formato longos/ovais, em que o cálculo de volume utilizado foi $Vol = 2 [(r^2) \times \pi \times h]$, em que: r = raio da largura testicular (L/2); $\pi = 3,1416$ e h = comprimento testicular.

A circunferência escrotal (CE) foi realizada segundo Hahn, Foote e Seidel (1969), com uma fita métrica milimetrada colocada na posição mediana do escroto, no ponto de maior dimensão, envolvendo as duas gônadas e a pele escrotal (Fotografia 3).



Fotografia 2 – Aferição do comprimento testicular com uso do paquímetro.



Fotografia 3 – Aferição da circunferência escrotal com uso de fita métrica.

4.4 COLHEITA E ANÁLISES DO EJACULADO

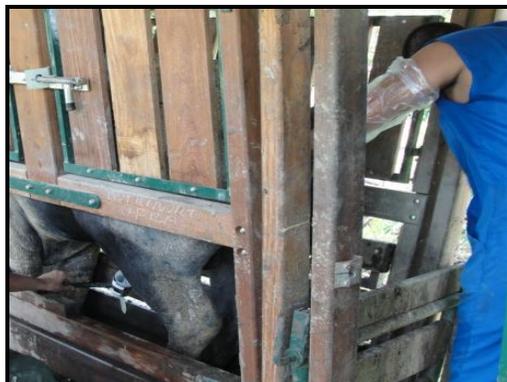
Inicialmente, as colheitas de sêmen dos machos bubalinos mestiços Murrah e Mediterrâneo, com idades compreendidas entre 12 a maior que 60 meses, foram realizadas por meio de massagem trans-retal das glândulas anexas e ampolas seminais por tempo de 3 minutos. Nos animais das faixas etárias entre 20 a 29 meses (3), animais de 30 a maior ou igual a 60 meses (8) que já apresentavam desenvolvimento corporal adequado para o uso dessas técnicas (Fotografia 4).

Nos animais das faixas etárias de 12 a 19 meses, porém, as colheitas começaram a partir da metade do trabalho e por meio de estímulo eletro-ejaculatório com duração de 1 minuto., uma vez que não foi possível obter ejaculado em razão das limitações no tamanho e condição corporal desses animais não permitirem o uso das massagens das glândulas acessórias.

As características físicas do ejaculado, tais como volume, aspecto, turbilhão, motilidade, vigor, foram analisadas imediatamente (Fotografia 5), seguindo padrões de avaliação de Vale (1994, 1997).

Para a concentração foi empregado a câmara de Neubauer da Central de Biotecnologia Animal (CEBRAN), onde a diluição foi realizada colocando-se 20 μ L de sêmen em 2 ml de formol salino tamponado, em tubos graduados.

Para a análise da morfologia espermática distendeu-se uma gota da amostra em uma lâmina, que posteriormente foi corada pelo método de Cerovsky. (CEROVYSKY, 1976). Foram analisadas 200 células, por lâmina, em microscópio óptico em objetiva de imersão (aumento de 100x), onde foram avaliados espermatozoides com patologias maiores e menores individualmente. (HENRY; NEVES,1998).



Fotografia 4 – Massagem transretal das ampolas e coleta de sêmen.



Fotografia 5 – Material utilizado para a avaliação qualitativa do sêmen.

4.5 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO E ANÁLISES DAS IMAGENS

O aparelho ultrassonográfico utilizado foi o modelo Mindray DP-2200, com transdutor linear trans-retal 75L50EAV, multi-frequencial de 5,0/7,5/10,0 MHz (Fotografia 6). Os dezenove animais foram submetidos a avaliações do parênquima testicular com o transdutor de frequência de 7,5 MHz, sendo realizadas duas imagens de cada testículo nos planos longitudinal-lateral e plano transversal-lateral. (Fotografia 7) Para se obter uma boa qualidade da imagem foi usado gel de contato (carboximetilcelulose), objetivando intensificar o contato entre o transdutor e o escroto.



Fotografia 6 – Aparelho ultrassonográfico com transdutor transretal.



Fotografia 7 – Posicionamento do transdutor nos testículos para obtenção das imagens.

Os valores de escala de cinza das imagens ultrassonográficas foram determinados a partir das imagens ecográficas do parênquima testicular nas respectivas faixas etárias e expressos em unidades de intensidade pixel. O alcance total das intensidades de pixel foi definido por valores numéricos de 0 a 255, em que o valor 0 representou a cor preta (anecoica) e o valor 255 representou o branco (hiperecoica). A partir destas imagens, foi determinada a ecodensidade testicular (ECOt), expressa em quantidade de pixel/área. Para esse fim, foi utilizado o Programa *Image J* que é um *software* de domínio público, baseado em um programa de processamento de imagem desenvolvido no *National Institutes of Health*, nos Estados Unidos, e que calcula a área e as estatísticas de pixel de valor definido pelo usuário (RASBAND, 1997, 2009).

A média das unidades pixel de cada testículo nos dois planos foi obtida a partir de cinco áreas de aproximadamente 1cm^2 , selecionadas aleatoriamente dentro do parênquima testicular (Imagens 3 e 4). Posteriormente, com os valores dos dois testículos foi obtida a média da ecodensidade testicular (ECOt) por animal.

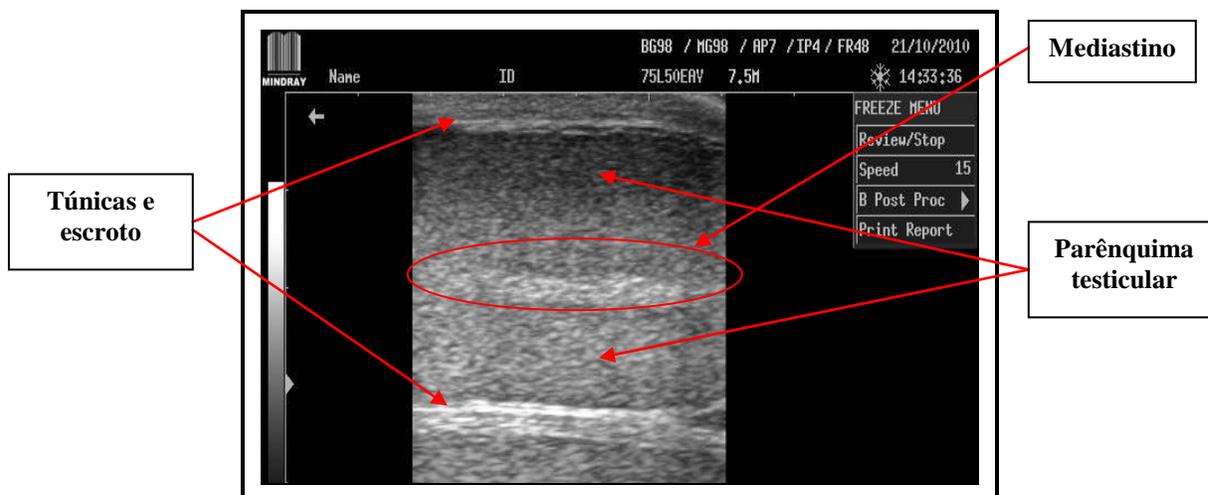


Imagem 3 – Imagem ecográfica longitudinal-lateral do parênquima testicular de um bubalino aos 18 meses de idade.

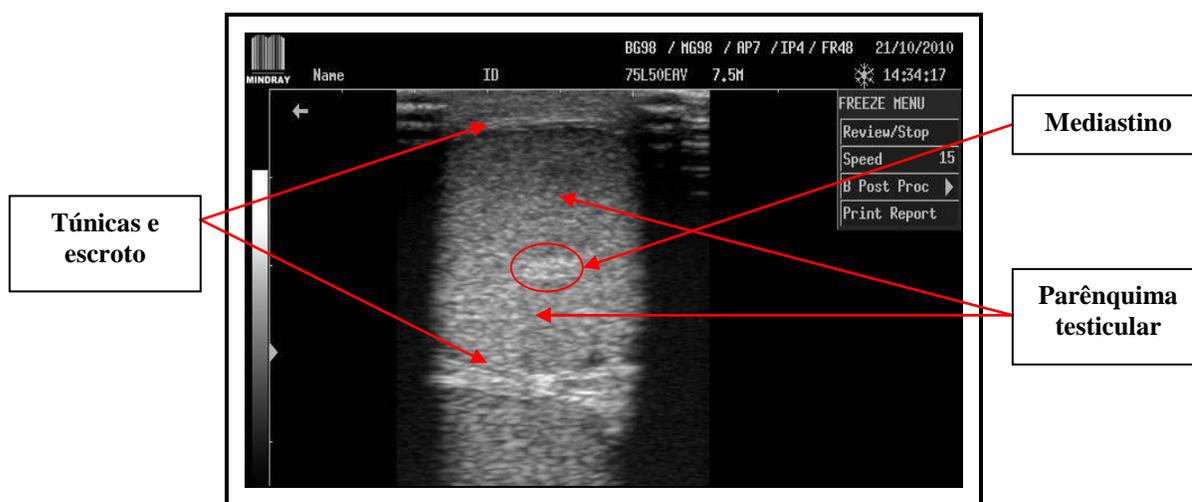
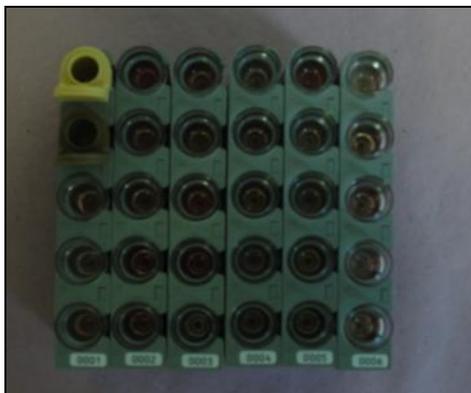


Imagem 4 – Imagem ecográfica transverso-lateral do parênquima testicular de um bubalino aos 18 meses de idade.

4.6 COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISE DE TESTOSTERONA

As amostras de sangue foram coletadas antes dos exames andrológicos e ultrassonográficos. O sangue foi colhido através de punção da veia jugular em frascos de 5 ml para posterior extração do soro e acondicionamento em microtubos tipo *ependorf* de 2 ml,

devidamente identificados e conservados a -20°C , até o momento das análises para aferir os níveis de testosterona (Fotografias 8 e 9).



Fotografia 8 – Amostras de soro sanguíneo.



Fotografia 9 – Processamento das amostras de soro sanguíneo.

A determinação dos níveis de testosterona foi realizada pelo Imunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* da testosterona em soro e plasma utilizando a técnica de imunoensaio de electroquimioluminescência (ECLIA), Sánchez-Carbayo et al. (1998) concebida para ser utilizada no analisador de imunoensaios Elecsys 1010/2010 da Roche Diagnostics que se encontrava na seção de laboratórios do Centro Nacional de Primatas (CENP), (Fotografia 10), para a obtenção das concentrações hormonais onde os valores hormonais foram expressos em ng/ml.



Fotografia 10 – Analisador automático *Elecsys* 2010 (Roche® Diagnostics).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em $\arcsin(x/100)$, os níveis de testosterona sanguínea (T) em $\log(x)$ e a concentração total, por ter muitas variáveis expressas em zero, em raiz quadrada $(x + 1)$ conforme sugestão de SAMPAIO (1998). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo procedimento proc GLM, considerando o efeito fixo de faixa etária. As médias foram comparadas por Teste de Duncan. Considerou-se o nível de significância em 5%.

Para a análise de regressão considerou-se como variável dependente a intensidade de pixel (pixel) e incluíram-se no modelo todas as variáveis: idade em dias (IDd) e meses (IDm), faixa etária (FXET), volume testicular total (VOLT), concentração espermática total do ejaculado (CONCt), motilidade (MOT), turbilhonamento (TURB), vigor (VIG), defeitos totais (DEFT). Utilizou-se o procedimento Proc REG do SAS rodado em stepwise (SAS, 1999).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOMETRIA TESTICULAR

Os resultados da Circunferência Escrotal (CE) estão na tabela 1. Podemos ver que as médias e desvios padrão foram de $12,88 \pm 0,51$ cm para os animais com 12 e 13 meses, $15,98 \pm 0,35$ cm nos animais de 14 e 15 meses, $16,55 \pm 0,28$ cm para os 16 e 17 meses, $17,34 \pm 0,27$ cm para os que apresentaram 18 e 19 meses, $18,83 \pm 0,37$ cm para os de 20 e 21 meses, $23,5 \pm 2,02$ cm aos de 22 e 23 meses, $24,11 \pm 0,36$ cm aos de 24 a 29 meses, $26,16 \pm 0,53$ cm de 30 a 35 meses, $27,38 \pm 0,58$ cm de 36 a 41 meses, $31,18 \pm 0,75$ cm de 42 a 47 meses, $28,31 \pm 0,49$ cm de 48 a 59 meses e $28,38 \pm 0,38$ cm aos machos com idade iguais ou maiores de 60 meses.

As medidas de volume testicular apresentam valores de $30,28 \pm 17,37$ cm³ em animais de 12 e 13 meses, $75,22 \pm 5,80$ cm³ para 14 e 15 meses, $83,21 \pm 5,27$ cm³ para 16 e 17 meses, $90,12 \pm 5,98$ cm³ para 18 e 19 meses, $134,81 \pm 11,01$ cm³ para 20 e 21 meses, $240,40 \pm 44,04$ cm³ de 22 e 23 meses, $282,89 \pm 11,31$ cm³ de 24 aos 29 meses, $359,93 \pm 23,91$ cm³ de 30 aos 35 meses, $410,80 \pm 26,28$ cm³ de 36 aos 41 meses, $611,96 \pm 38,69$ cm³ de 42 aos 47 meses, $471,92 \pm 22,69$ cm³ de 48 aos 59 meses e $534,25 \pm 25,36$ cm³ para maior ou igual a 60 meses de idade.

Os animais das faixas etárias 12, 14, 20, 22, 24 e 36 meses apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$); com as outras faixas etárias, porém entre as faixas de 16 e 18; 42 e 48; 30 e 60 não houve diferença estatística. (tabela 1), verificou-se um crescimento positivo da circunferência escrotal que variou de 11,3 cm a 34,5 cm, entre 12 a 60 meses de idade, onde as medidas de CE aumentam progressivamente com o avanço da idade dos animais.

Houve diferença estatística nos animais de todas as faixas etárias 12, 20, 22, 24, 30, 36, 60 porém as faixas etárias (14, 16, 18) e (42, 48) não apresentaram diferença estatística entre elas, igualmente (Tabela 1) mostra um crescimento progressivo que varia de $17,4$ cm³ a $719,2$ cm³, entre, 12 a 60 meses de idade demonstrando que as medidas de volume aumentam com o avanço da idade dos animais

Tabela 1 – Circunferência escrotal e Volume testicular (média e desvio padrão) de machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) (n=19) de acordo com a faixa etária, avaliados num período de 6 meses consecutivos mantidos a pasto na Amazônia Oriental.

Faixa etária	Circunferência Escrotal (cm)	Volume testicular (cm ³)
12	12,88±0,51 g	30,28±17,37 g
14	15,98±0,35 f	75,22±5,80 f,g
16	16,55±0,28 f	83,21±5,27 f,g
18	17,34±0,27e,f	90,12±5,98 f,g
20	18,83±0,37 e	134,81±11,01 f
22	23,5±2,02 d	240,40±44,04 e
24	24,11±0,36 d	282,89±11,31 e
30	26,16±0,53 c	359,93±23,91 d
36	27,38±0,58 b,c	410,80±26,28 c,d
42	31,18±0,75 a	611,96±38,69 a
48	28,31±0,49 b	471,92±22,69 b,c
60	28,38±0,38 b	534,25±25,36 b

Médias seguidas com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan (P < 0,05) M±DP=Média ± Desvio Padrão.

Os dados de circunferência escrotal encontrados foram menores aos relatados por Villares, Ramos e Rocha (1979) em raças Jafarabadi e Murrah. Também foram menores aos achados por Ohashi (1993) e Ohashi et al. (2007) em mestiços mediterrâneo x Jafarabadi que segundo o autor eram mantidos em excelentes condições de manejo extensivo. Nosso estudo a média encontrada para búfalos com idades iguais ou maiores 60 meses de idade foram menores aos dados de Bhosrekar (1993) para búfalos indianos.

As médias nas faixas etárias de 12, 18 e 24 meses de idade em nosso experimento também foram menores as achadas por Pacheco et al. (2005) em machos mestiços murrah x jafarabadi nas respectivas faixas etárias. Também foram menores aos resultados de Vale et al. (2008) em touros Murrah entre 12 a 60 meses e também menores aos citados por Ahmad et al. (2010) em machos Nili-Ravi de 1, 6, 12, 18 e 24 meses de idade.

Entretanto nossos resultados foram maiores aos encontrados por Bongso, Hassan e Nordin (1984) e aos de McCool e Entwistle (1989) em búfalos do pântano. A media encontrada entre 35 a 41 meses no nosso estudo, foram similares aos achados por Vale et al. (2001, 2004) que trabalharam com touros Murrah entre 30-36 meses de idade.

Em relação ao crescimento da circunferência escrotal, nossos dados, concordam com Ahmad et al. (1984); Bongso, Hassan e Nordin (1984); Ohashi (1993); Aguiar (1993); Vale et al. (2001, 2004); Vale (2006) e Montes, Pérez e Martinto (2007) que afirmaram observar uma

correlação positiva entre idade e circunferência testicular, corroborando aos achados em bovinos por Coulter, Larson e Foote (1975); Carter, Wood e wrigth (1980); Chandolia et al.(1997b) e Brito et al. (2004) que citaram que o diâmetro testicular aumentou de forma linear a medida que aumentava a idade.

As médias da circunferência verificadas no presente estudo foram menores que a maioria dos estudos realizados em bufalos no Brasil, assim como, na Índia, este fato pode estar relacionado ao tipo de criação e ao padrão genético dos animais do experimento. De acordo com Vale et al. (2008), bufalos criados extensivamente, nos períodos secos, onde a falta de alimento e pastagem adequada, sofrem perda de peso acentuada e, por conseguinte, de massa testicular e da circunferência escrotal, recuperando nos períodos de disponibilidade das pastagens, que se faz de forma sazonal.

Barbosa (2009) também na Amazônia encontrou em bubalinos jovens criados em sistema intensivo e em animais adultos criados em sistema extensivo resultados similares com nosso trabalho. Todavia cita valores inferiores ao nosso trabalho tanto em machos jovens, assim como, adultos criados de forma extensiva e em sistema intensivo, respectivamente..

No que se refere tipo de criação, Vale (2006) reporta que em alguns rebanhos na Ilha de Marajó e das regiões do Médio e Baixo Amazonas, devido o tipo de criação e manejo extensivo a que são submetidos os rebanhos, com um sistema de reprodução sem controle zootécnico e reprodutivo, torna-se um fator limitante ao desenvolvimento dos rebanhos nessas regiões. O autor enfatiza que no sistema intensivo a ausência de material genético exótico, ou seja, que não mantenha nenhum grau de parentesco entre os rebanhos regionais é um fator limitante para a consanguinidade neste tipo de rebanho.

Podemos observar (tabela.1) um aumento do volume estatisticamente significativo que começa na faixa etária de 20-21 meses para a faixa de 22-23 meses. Os valores de volume testicular achados em nosso trabalho foram maiores aos encontrados por Bongso, Hassan e Nordin (1984) em búfalos do pântano, porém menores aos mensurados por Pacheco et al. (2005) em mestiços Murrah x Jafarabadi com 12, 18 e 24 meses de idade.

No Gráfico 1 visualizamos que a medida que aumenta a idade se evidencia um aumento da circunferência escrotal que esta acompanhado de aumento do volume testicular demonstrando que os animais das faixas etárias com 22 e 23 meses, 24 a 29 meses, 30 a 35 meses e 36 a 41

sofrem um crescimento rápido do volume testicular em relação aos animais de 12 a 21 meses e que este crescimento corresponde ao aumento dos tubulos seminíferos como relataram Amann (1962) e Llauro e Dominguez (1963), encontrando-se em um estágio de desenvolvimento sexual rápido como relatado por Fields, Burns e Warnick (1979), em bovinos.

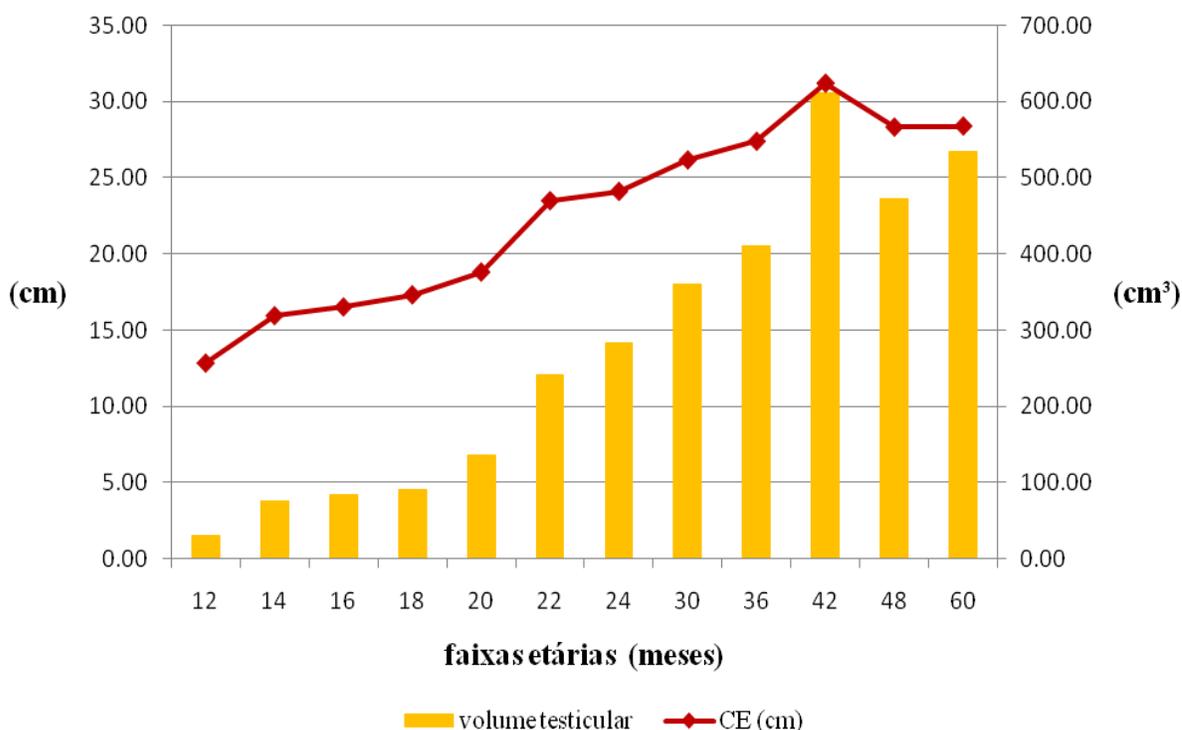


Gráfico 01 – Desenvolvimento testicular de circunferência escrotal (cm) e volume testicular (cm³) de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária.

5.2 COLETAS E ANÁLISE DE SÊMEN

Nos animais de 12 a 19 meses em função da idade e do tamanho, obtivemos somente dois ejaculados. Nos das faixas de 20 a 29 meses foram obtidos 25 ejaculados, e dos animais de 30 meses a maiores ou iguais a 60 meses foram obtidos 12 ejaculados.

As médias e desvio padrão para a concentração ($\times 10^6$) os animais de 16 e 17 meses foi de $5,5 \pm 3,5(a)$, para 20 e 21 meses foi de 1.720, para 22 e 23 meses foi de $33,75 \pm 28,75$, para os

animais de 24 a 29 meses foi de $807,25 \pm 522,90$, de 30 a 35 meses foi de $216,51 \pm 68,54$, de 36 a 41 meses foi de $89 \pm 61(a)$, para os machos de 42 a 47 meses foi de $819,375 \pm 561,345$, para a faixa etária de 48 a 59 meses foi de $769,16 \pm 430,58$ e de $51,41 \pm 26,02$ para maiores ou iguais a 60 meses .

Na motilidade espermática as porcentagens obtidas para animais com 16 e 17 meses foi 10%, para 20 e 21 meses foi de 80%, para 22 e 23 meses, 45 ± 5 % entre 24 a 29 meses $42,72 \pm 7,01$ %, entre 30 a 35 meses $24,16 \pm 6,08$ % entre 36 a 41 meses $22,5 \pm 17,5$ %, para 42 a 47 meses $43,75 \pm 17,95$ %, de 48 a 59 meses $60 \pm 15,27$ % e maior ou igual 60 meses $80 \pm 5,77$ % de motilidade.

Para defeitos espermáticos totais, para idades de 16 e 17 meses foi de 18,5 % para a faixa etária de 22 e 23 meses foi de $9,5 \pm 2,5$ %, entre 24 a 29 meses foi de $12,28 \pm 1,61$ % entre 30 a 35 meses foi de $10,36 \pm 1,75$ % entre 36 a 41 meses foi de $16,5 \pm 4$ %, de 42 a 47 meses foi de $6,16 \pm 1,01$ %, entre 48 a 59 meses foi de $8,67 \pm 3,48$ %, e maior ou igual a 60 meses foi somente de 3%.

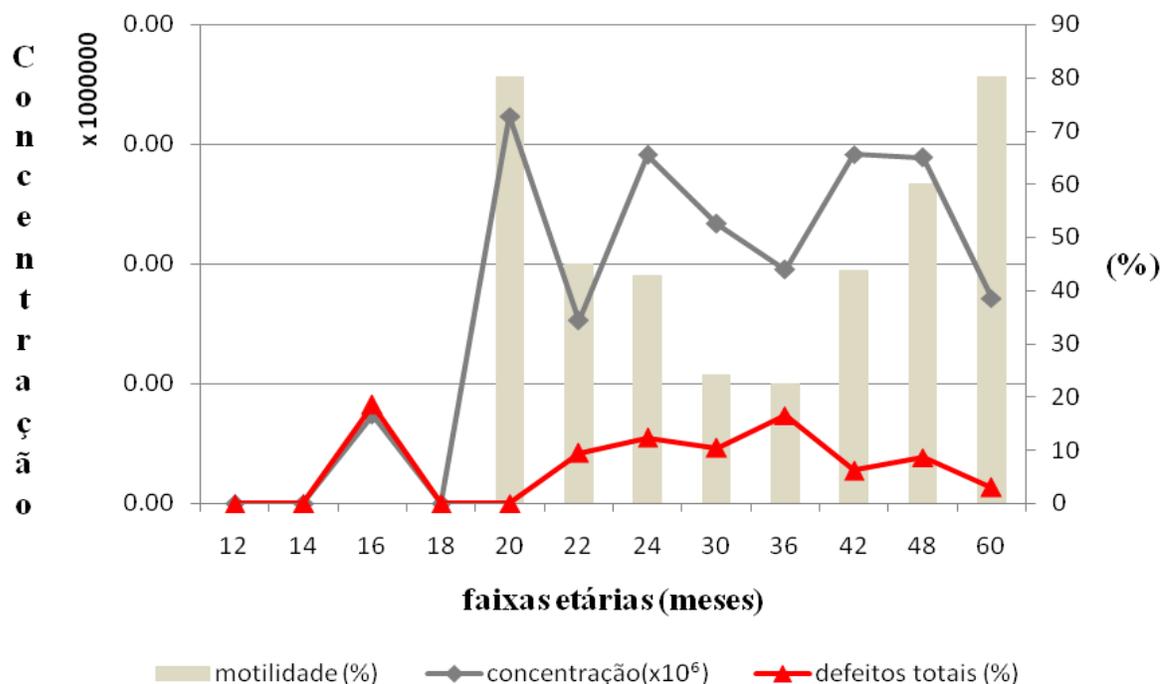


Gráfico 02 – Comparativo entre as médias de concentração, motilidade e defeitos totais espermáticos de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.

No Gráfico 02 acima, observamos que à medida que aumenta a idade dos animais, existe uma tendência de aumentar a concentração espermática, entretanto sem manter uma uniformidade, possivelmente pelo baixo número de ejaculados obtidos. No entanto, observamos que nas faixas etárias de 20 e 60 meses encontram-se as maiores porcentagens de motilidade. Coimbra (2002) e Viana (2006) relataram que em búfalos doadores de sêmen na Amazônia, na época menos chuvosa, os valores de motilidade são menores que na época chuvosa.

Vianna (2006) encontrou diferenças significativas na qualidade do ejaculado na espécie bubalina. Segundo o autor, essa diminuição da motilidade entre as faixas 22 a 36 meses pode estar relacionada com a época de coleta, entre os períodos seco e chuvoso. Enfatiza, ainda, melhorias na qualidade do sêmen quando comparado com animais suplementados com mistura mineral.

Quanto aos defeitos de morfologia, os valores acima demonstrados não manifestam uma alta porcentagem de patologia, o que é considerado aceitável, segundo Vale (1997).

Em linhas gerais, os dados de concentração e motilidade apresentam valores acima dos encontrados por Barbosa (2009) na Amazônia, em animais menores e maiores de 4 anos criados em sistemas extensivos e intensivos, respectivamente. Quanto os defeitos espermáticos os dados demonstram valores menores.

Por outro lado, nos animais de 48 a 59 meses, os dados demonstram valores menores aos encontrados por Garcia (2009) em búfalos de 50 meses, criados na Amazônia, antes de serem submetidos a insulação testicular coletados por vagina artificial, cujos dados para concentração motilidade e defeitos totais espermáticos foram, respectivamente, de $1.355,92 \pm 687,79 \times 10^6$ spz/ml, $78,97 \pm 8,1\%$ e $5,79 \pm 3,17\%$.

Em relação aos dados das análises físicas, os valores encontrados são menores se comparados com os de Aguiar et al. (1996) coletados por vagina artificial em búfalos Murrah clinicamente sadios, criados extensivamente, entre quatro e oito anos de idade, obtendo valores de $78,63 \pm 5,60\%$ para motilidade, $116,63 \pm 17,52 \times 10^7$ spz/ml para concentração e $13,14 \pm 5,18\%$ de defeitos.

5.3 TESTOSTERONA

Os níveis de testosterona nos animais de 12 e 13 meses foi de $0,070 \pm 0,026$ ng/ml, para 14 e 15 meses, foi de $0,111 \pm 0,021$ ng/ml, para 16 a 17 meses, foi de $0,073 \pm 0,013$ ng/ml, já para a faixa etária dos 18 e 19 meses foi de $0,079 \pm 0,013$ ng/ml, os animais de 20 a 21 meses foi de $0,125 \pm 0,024$ ng/ml, para os de 22 a 23 meses foi de $0,124 \pm 0,049$ ng/ml, os de 24 aos 29 meses, mostraram uma média de $0,155 \pm 0,025$ ng/ml. A partir da faixa etária de 30 aos 35 meses observamos um aumento significativo de $0,700 \pm 0,155$ ng/ml mantendo-se alta nas faixas etárias dos 36 aos 60 meses.

Observou-se que nos animais de 12 a 19 meses os níveis de testosterona apresentaram níveis baixos do hormônio, mas a partir dos 20 e 21 meses de idade inicia-se um aumento progressivo dos níveis de testosterona alcançando seu maior pico nos animais com idades maiores a 60 meses. Estatisticamente não houve diferença entre os animais das faixas etárias (12 até 24 meses) como mostra a (Tabela 02).

Tabela 2 – Médias, desvio padrão, frequência, valores mínimos e máximos de níveis de testosterona de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.

Faixa etária	Idades (meses)	Frequência	Testosterona \pm DP ng/ml	Mínimo	Máximo
12	12 e 13	6	$0,070 \pm 0,026$ c	0,020	0,173
14	14 e 15	23	$0,111 \pm 0,021$ c	0,020	0,347
16	16 e 17	31	$0,073 \pm 0,013$ c	0,020	0,312
18	18 e 19	34	$0,079 \pm 0,013$ c	0,020	0,356
20	20 e 21	18	$0,125 \pm 0,024$ c	0,020	0,383
22	22 e 23	5	$0,124 \pm 0,049$ c	0,020	0,277
24	24 e 29	22	$0,155 \pm 0,025$ c	0,020	0,509
30	30 e 35	33	$0,700 \pm 0,155$ b	0,020	3,330
36	36 a 41	12	$0,466 \pm 0,175$ a	0,020	2,120
42	42 a 47	14	$0,477 \pm 0,134$ c	0,020	1,660
48	48 a 59	12	$0,542 \pm 0,215$ c	0,092	2,440
60	> ou igual 60	17	$2,762 \pm 0,457$ b	0,058	5,730

Médias seguidas com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)
 $M \pm DP = \text{Média} \pm \text{Desvio Padrão}$.

Os dados demonstram uma correlação positiva entre a concentração de testosterona e a idade (Tabela 4), confirmando que à medida em que aumenta a circunferência escrotal, aumenta a secreção do hormônio, fato este publicado por Ohashi (1993) e Ohashi et al. (2007).

Foram encontrado níveis basais de testosterona de 0,2 ng/ml concordando com o encontrado por Perera et al. (1979) em bubalinos Murrah. Também, o maior nível de testosterona encontrado foi de 2.76ng/ml, o que Chacur (1999) observa que poderia influenciar no desempenho reprodutivo dos touros nos trópicos, uma vez que a concentração de testosterona nos bubalinos é menor do que em outras espécies domésticas.

A Tabela 2 revela que nos animais entre 12 a 16 meses de idade foram registrados níveis de testosterona acima de 0.070ng/ml, o que não foi possível observar nas pesquisas feitas por Agarwal et al. (1983) e Melo et al. (1989), os quais relataram que os níveis encontravam-se abaixo do limite de detecção da análise (20 pg/ml).

De acordo com a Tabela 2 acima e o Gráfico 3, os níveis de testosterona entre 24 e 36 meses apresentam aumento significativo. Nesse sentido, Ribeiro (2006) observa que na Amazônia, em criações extensivas, em áreas alagadiças, localizadas em clima quente e úmido, a puberdade pode ser alcançada na faixa de 24 a 36 meses, exatamente na faixa que demonstra níveis de testosterona indicativos do início da puberdade, segundo Sharma et al. (1984), que afirmam que níveis de até 450 pg/ml podem indicar o início da puberdade e que níveis entre 800 a 1000 pg/ml os animais alcançam a maturidade sexual.

Tendo em vista que as coletas sanguíneas foram feitas por um período de seis meses em diferentes horários, durante a aferição das análises de testosterona foram evidenciados diferentes níveis de testosterona no mesmo animal, o que também foi relatado por Chantaraprateep et. al. (1981); Agarwal et al. (1983); Sharma et al. (1984); Gunarajasingam et al. (1985), os quais encontraram diferentes níveis de testosterona ao dia em seus experimentos

5.4 ECOGENICIDADE

Em animais de 12 a 13 meses apresentaram medias de pixel de $78,67 \pm 6,36$ onde as imagens ecográficas dos animais da faixa etária 12 meses mostraram aparência ecogênica de baixa intensidade e alguns animais o mediastino testicular apresentou-se com baixa ecogenicidade dificultando a identificação na imagem (Imagens 5.1- 5.2).

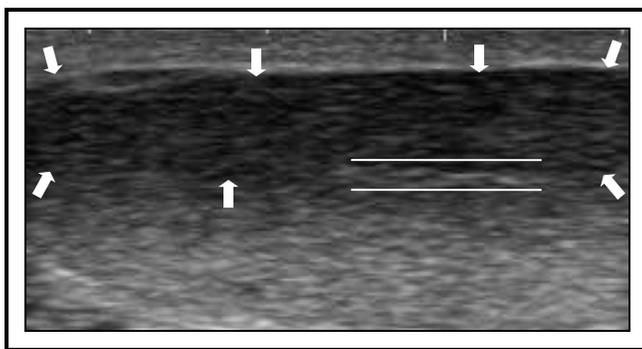


Imagem 5.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 12 meses de idade. Região de baixa intensidade ecográfica demarcada por setas. Mediastino testicular delimitado por linhas.

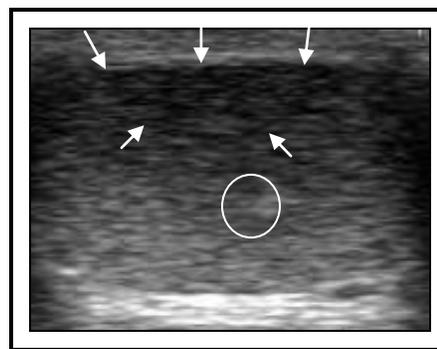


Imagem 5.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 12 meses de idade. Região de baixa intensidade ecográfica demarcada por setas. Mediastino delimitado por círculo.

Nos animais entre 14 e 15 meses a média de pixel apresentou valores de $94,22 \pm 3,40$, mostrando imagens do parênquima testicular com regiões de maior ecogenicidade de intensidade média e poucas regiões com ecogenicidade de intensidade baixa, o mediastino testicular mostrando aumento da espessura, tornando-se mais evidente (Imagens 6.1 - 6.2).

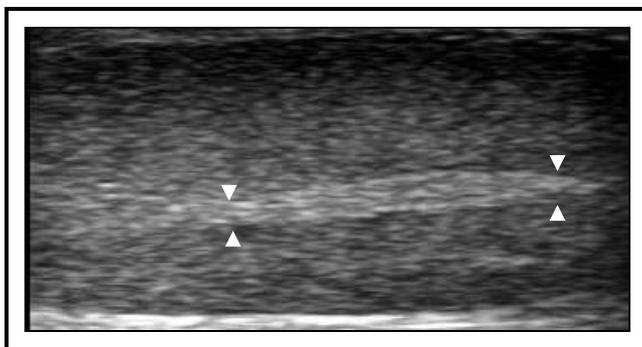


Imagem 6.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 14 meses de idade. Parênquima testicular com proporção maior de ecogenicidade e de intensidade média. Mediastino testicular (setas).

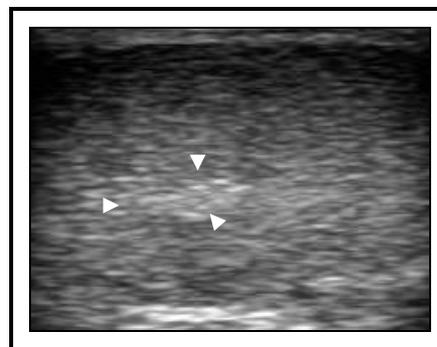


Imagem 6.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 14 meses de idade. Mediastino testicular (setas).

Entre 16 e 17 meses a meia apresentou-se com $88,16 \pm 3,95$ (pixel) mostrando imagens de todo o parênquima testicular com ecogenicidade de media intensidade e o mediastino é bem evidente como uma linha hiperecoica que encontra-se no meio do parênquima testicular. (Imagens 7.1 - 7.2).

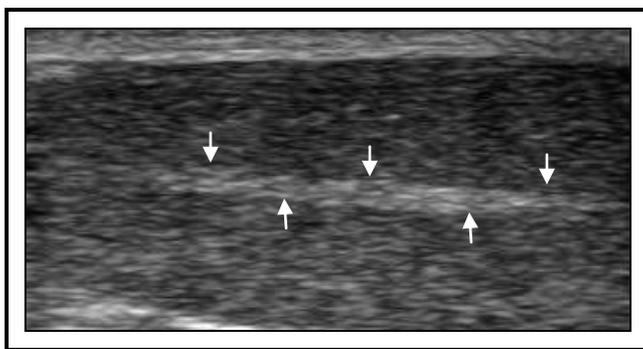


Imagem 7.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 16 meses de idade. Parênquima testicular com ecogenicidade de intensidade média. Mediastino testicular (setas).

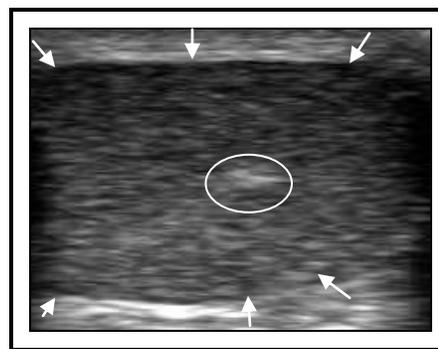


Imagem 7.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 16 meses de idade. Parênquima testicular (setas). Mediastino testicular (círculo).

De 18 a 19 meses a média foi de $96,09 \pm 3,40$ pixel e as imagens nesta faixa, o parênquima testicular apresentou-se com ecogenicidade de alta intensidade em quase a totalidade do parênquima e regiões de ecogenicidade média mostrando o mediastino como uma linha hiperecoica fina de difícil identificação. (Imagens 8.1 - 8.2).

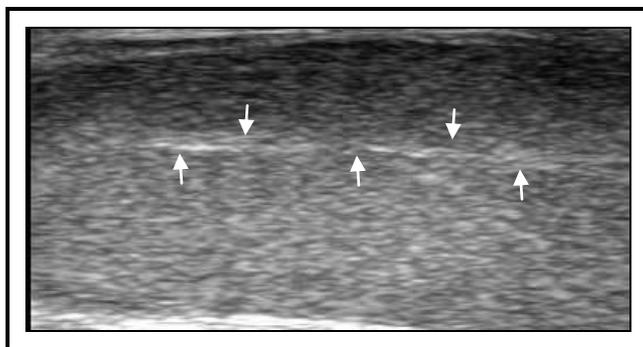


Imagem 8.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 18 meses de idade. Mediastino testicular em linha hiperecoica (setas).

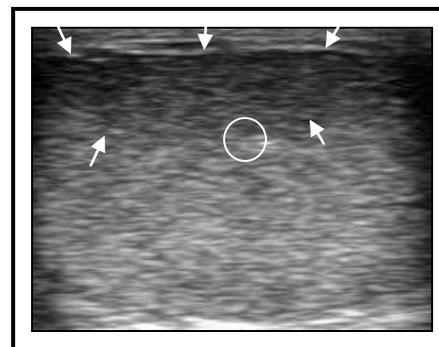


Imagem 8.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 18 meses de idade. Região do parênquima testicular com ecogenicidade média (setas). Mediastino (círculo).

Para os animais de 20 e 21 meses foram obtidas médias de pixel de $103,12 \pm 3,86$ observando-se nas imagens ecogenicidade de media intensidade quase em todo o parênquima testicular e algumas regiões de baixa intensidade (Imagem 9.2). Mostrando o mediastino como uma linha hiperecoica (Imagem 9.1) bem delimitada com maior espessura que os animais menores de 20 meses.

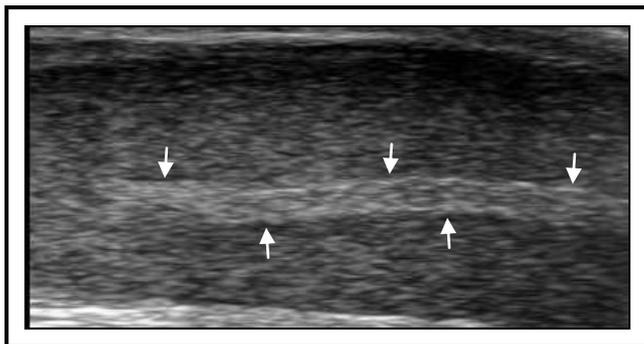


Imagem 9.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 20 meses de idade. Mediastino bem delimitado (setas).

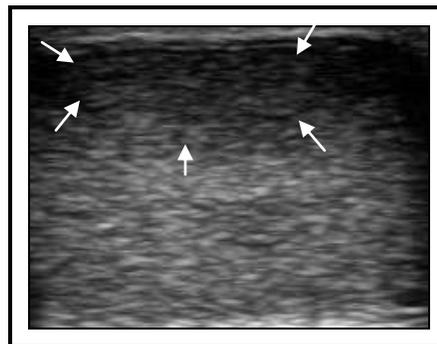


Imagem 9.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 20 meses de idade. Região do parênquima testicular com intensidade baixa (setas).

Para a faixa etária de 22 e 23 meses o valor meio foi de $98,4 \pm 5,87$ pixel e algumas imagens apresentam ecogenicidade de alta intensidade em todo o parênquima testicular e o mediastino apresenta uma linha hiperecoica fina de maior intensidade que os animais de 22 meses que divide todo o parênquima testicular nas imagens longitudinais e nas transversais o mediastino mostra-se como um ponto hiperecoico. (Imagens 10.1 – 10.2).

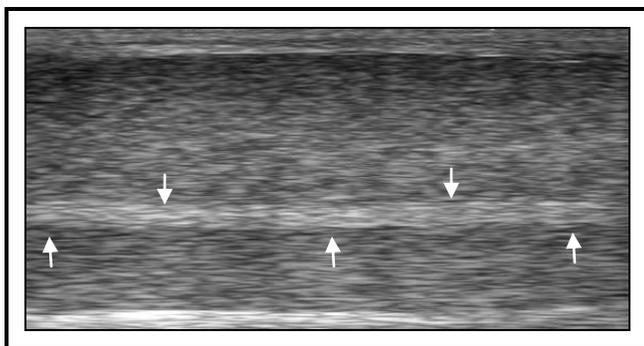


Imagem 10.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 22 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica fina (setas).

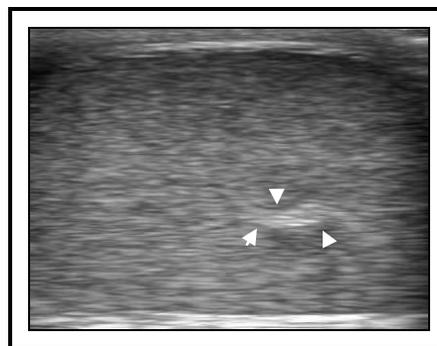


Imagem 10.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 22 meses de idade. Mediastino testicular (setas).

Entre as faixas etárias de 24 aos 29 meses a média foi de $114,05 \pm 2,42$ pixel e as imagens apresentaram ecogenicidade de alta intensidade em quase todo o parênquima mostrando regiões de intensidade média (Imagem 11.1) e o mediastino mostrou maior espessura, mas não todas as

imagens dividem todo o parênquima testicular, na imagem transversal também é possível ver um ponto hiperecótico que representa o mediastino (Imagem 11.2)

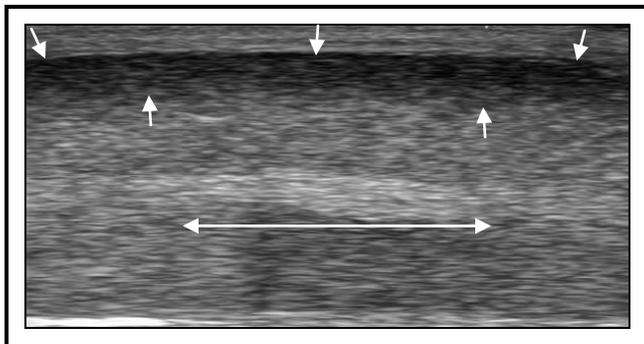


Imagem 11.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 24 meses de idade. Região de ecogenicidade média (setas). Mediastino (linha horizontal com setas).

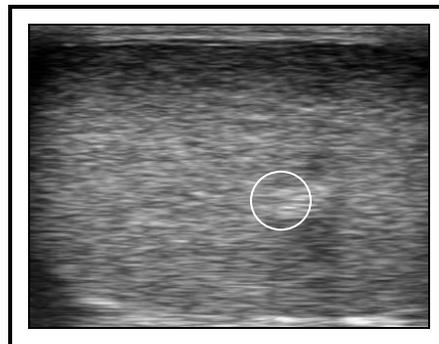


Imagem 11.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 24 meses de idade. Mediastino (círculo).

Nos animais de 30 aos 35 meses de idade, foram obtidas valores de $109,24 \pm 3,13$ pixel. Mostrando imagens com os maiores níveis de pixels apresentando o parênquima testicular com ecogenicidade de alta intensidade e o mediastino como uma leve linha hiperecoica que divide o parênquima testicular (Imagens 12.1 –12.2).

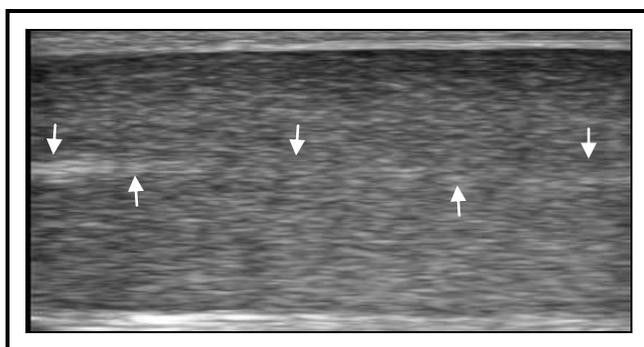


Imagem 12.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 33 meses de idade. Parênquima com ecogenicidade homogênea. Mediastino que divide parênquima testicular (setas).

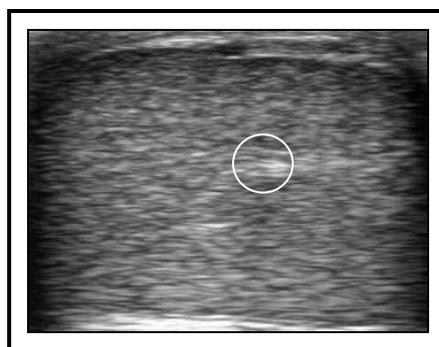


Imagem 12.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 33 meses de idade. Mediastino (círculo).

De 36 aos 41 meses o valor medio foi de $98,67 \pm 3,05$ pixel e as imagens mostraram um parênquima testicular com ecogenicidade de intensidade uniforme e o mediastino se apresentou como uma linha hiperecoica bem definida que divide o parênquima testicular e na imagem transversal um ponto hiperecoico bem definido (Imagens 13.1-13.2).

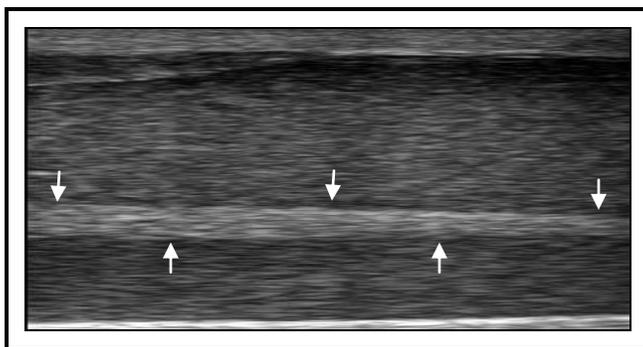


Imagem 13.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 36 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica que divide o parênquima (setas).



Imagem 13.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 36 meses de idade. Mediastino em ponto hiperecoico (círculo).

Entre 42 aos 47 meses de idade a media foi $99,33 \pm 2,01$ pixel, entre 48 aos 59 meses foi de $96,17 \pm 1,90$ pixel e maiores ou igual a 60 meses de idade foi $90,13 \pm 1,77$ pixel. A partir dos 42 meses (Imagens 14.1-14.2) a 60 meses (Imagens 15.1-15.2) o parênquima testicular apresenta uma conformação homogênea mostrando intensidade media de ecogenicidade que diminui levemente a medida que avança a idade o mediastino se apresenta como uma linha hiperecoica de fácil identificação que delimita o parênquima testicular e nas imagens transversais um ponto hiperecoico no centro do parênquima.

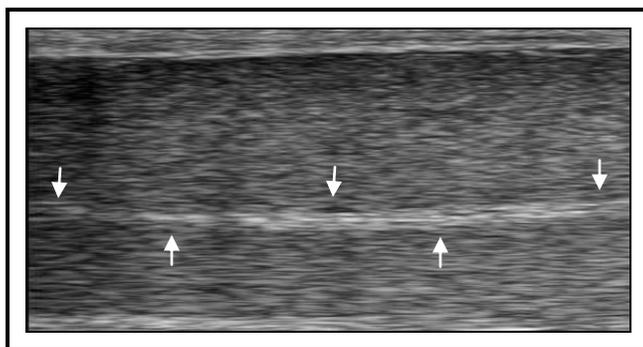


Imagem 14.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 48 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica fina que divide o parênquima testicular (setas).

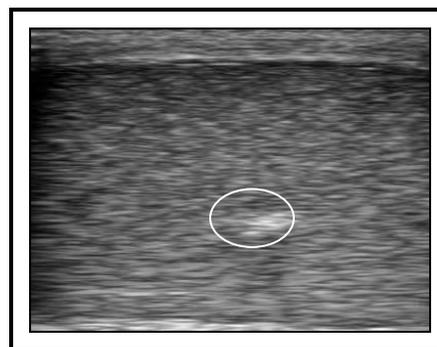


Imagem 14.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 48 meses de idade. Mediastino em ponto hiperecoico central (círculo).

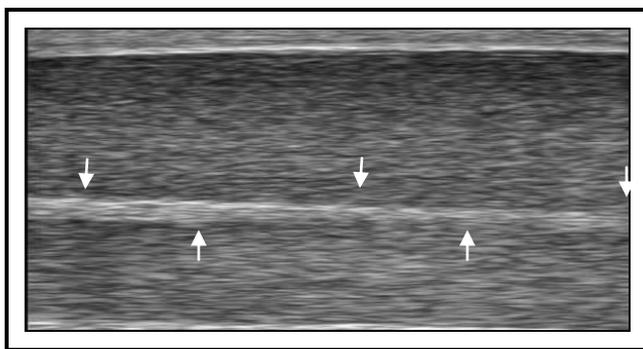


Imagem 15.1 – Ecografia longitudinal lateral do parênquima testicular bubalino com 60 meses de idade. Mediastino em linha hiperecoica fina (setas) que divide o parênquima.

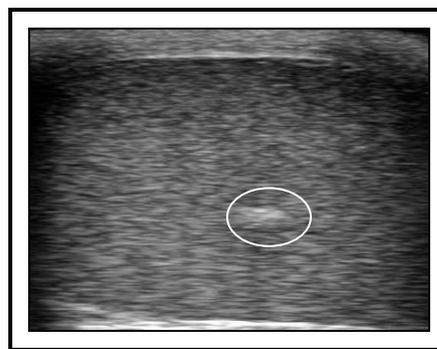


Imagem 15.2 – Ecografia transversal lateral do parênquima testicular bubalino com 60 meses de idade. Mediastino em ponto hiperecoico central (círculo).

Houve diferença estatística nos animais de todas as faixas etárias, mas somente a faixa etária dos 12 meses mostrou-se diferente estatisticamente comparando-a com todas as faixas etárias. Entretanto, as faixas (14, 18 e 22), (16 e 36), (20, 42, 48) e (24, 30, 60), meses de idade não apresentaram diferença estatística, como mostra a Tabela 3.

Observou-se um crescimento progressivo da ecogenicidade entre 12 e 15 meses, entre 16 e 17 meses a ecogenicidade diminui novamente, mas apresenta aumento entre 18 e 19 meses em relação a os animais que estão entre 12 a 19 meses, entre os animais de 20 e 21 meses continua aumentando para diminuir levemente entre 22 e 23 meses de idade.

Entre os 24 a 35 meses de idade foram obtidos os maiores valores de ecogenicidade, mas já entre 36 a 41 meses a ecogenicidade começa a diminuir e continua levemente entre 42 a 59 meses para obter o menor valor entre os animais maiores de 60 meses apresentando valores de ecogenicidade que estatisticamente não tiveram diferença ($P < 0,05$).

Tabela 3 – Intensidade Ecográfica testicular em pixels (média e desvio padrão, valores mínimos e máximos) (n=19) de machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de 6 meses na Amazônia Oriental.

Faixa etária	ECOT (pixels)	Mínimo	Maximo
12	78,67±6,36 d	68	90
14	94,22±3,40 b,c	71	113
16	88,16±3,95 c	53	131
18	96,09±3,40 b,c	61	132
20	103,12±3,86 a,b,c	67	127
22	98,4±5,87 b,c	77	110
24	114,05±2,42 a	92	132
30	109,24±3,13 a,b	81	137
36	98,67±3,05 b,c	74	111
42	99,33±2,01 a,b,c	83	108
48	96,17±1,90 b,c	85	105
60	90,13±1,77d,c	76	103

Médias seguidas com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) $M \pm DP = \text{Média} \pm \text{Desvio Padrão}$.

A aparência ultra-sonografia dos testículos dos animais no presente trabalho foi similar a descrita por Pechman e Eilts (1987); Cartee et al. (1989) e Gàbor et al. (1998) em estudos realizados com bovinos. Assim sendo, nossos resultados estão de acordo com os autores acima citados que afirmam que a técnica não é invasiva, é de fácil execução. Trabalhos realizados em eqüinos por Brass et al. (1989) também chegaram a similar conclusão.

Os parênquimas testiculares dos animais no referido estudo revelaram testículos normais sem lesões testiculares palpáveis e não palpáveis. Observações citada por Chapwanya et al. (2008) em estudo com bovinos e também por Jucá (2005) em carneiros de 18, 30 e 48 meses de idade que segundo o autor mostrou ecotextura do parênquima testicular variações em todas as idades com imagens hipocóicas de baixa e de alta intensidade.

As modificações na ecotextura do parênquima testicular verificadas no presente estudo, são indicadores que pode refletir detalhes importantes dos estágios de desenvolvimento testicular. Abdel-razek e Ali (2005) avaliaram tais mudanças da estrutura interna do escroto e testículo durante o seu desenvolvimento, os autores atribuíram estas modificações à proliferação celular e produção de fluidos.

Nossos dados revelam um padrão de desenvolvimento complexo de aumento e diminuição dos valores numéricos de pixel nas diferentes faixa etárias. Similares observações foram registrados por Chandolia et al. (1997a, 1997b) em carneiros e bovinos respectivamente. E por Aravindakshan et al. (2000) estudando bezerros na faixa etária até 2 anos de idade.

Nossa interpretação da ecogenicidade verificada nas respectivas faixa etária, estão de acordo com os resultados de Pechman e Eilts (1987); Cartee et al. (1989), Pastore (2008); Cardilli et al. (2009a, 2009b, 2010) que afirmaram que o parênquima testicular de animais jovens é homogêneo e com baixa ecogenicidade, aumentando em proporção direta com a idade dos animais.

Outro estudo similar aos nossos resultados foi de Carmo (2008), o autor verificou que os valores de pixels registrados de animais púberes apresentaram ecotextura maior do que a ecotextura do parênquima testicular de animais impúberes. Esse autor descreve que o mediastino se apresenta como uma linha hiperecoica no centro do parênquima, e sua espessura aumenta e fica mais evidente com o avançar da idade dos animais. Para Carmo (2008) as túnicas testiculares são visualizadas como uma linha hiperecoica que circunda todo o parênquima.

As modificações nas medias e desvio padrão de pixels do nosso estudo, estão em concordância com o relatado por Curtis e Aman (1981) os autores dizem, que o período de maturidade sexual e o aumento em unidades de pixel deve-se ao início da divisão das espermatogônias e à formação gradual de mais tipos de células maduras durante a espermatogênese.

Neste contexto fisiológico, Evans et al (1995, 1996) demonstraram em bovinos que durante o período de maturação sexual, o conteúdo celular sofreu modificações no lúmen dos túbulos seminífero, segundo os autores, devendo ser esta alteração provocada pela iniciação da secreção de fluidos e desta forma diminuir as medias de pixel. Modificação verificada na faixa etária dos 36 a 60 meses de idade, do presente trabalho. Para Aravindakshan et al. (2000) tais modificações, provavelmente reflete a proliferação celular.

Outro estudo que correlaciona o aumento da intensidade de pixels entre perímetro escrotal de animais de diferentes idades, se deve ao amadurecimento testicular e a multiplicação das células germinativas é relatado por Brito et al. (2004). Carmo (2008) relata que esse aumento da ecotextura do parênquima testicular pode estar associado ao aumento da idade que pode ser atribuído à crescente proliferação celular e a diminuição da produção de fluidos nesse órgão com a aproximação da puberdade. O autor deduziu que o aumento da ecotextura ocorreu provavelmente devido ao aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos na fase inicial da puberdade.

Que segundo Ribeiro (2006), citou que a puberdade em bubalinos criados de forma extensiva na Amazônia pode ocorrer na faixa etária de 24 a 36 meses. Desta forma, os resultados do nosso trabalho com relação a puberdade e maturidade sexual, mostram-se dentro do intervalo de idades discutida na literatura.

Em Ovinos Chandolia et al., (1997a) reportaram que grande parte do aumento nos valores numéricos de pixel, ocorreu num contexto de elevação de altas concentrações séricas de testosterona. Os autores concluíram que o aumento nos valores numéricos de pixel podem ser devido à formação gradual dos tipos de células mais madura da espermatogênese. Fato este, mostrado no gráfico 2 do presente estudo.

Por outro lado, também podemos ressaltar como reportado por Chandolia et al. (1997a); Aravindakshan et al. (2000) e Brito et al. (2004). Estes autores, descreveram que a redução inicial nos valores numéricos de pixel nos animais prepubere provavelmente reflete a produção de líquido nos testículos, comumente vista antes do início da espermatogênese ou explicada pelo aumento significativo no volume dos túbulos.

5.5 CORRELAÇÕES

Foram verificadas altas correlações entre os parâmetros avaliados ($p < 0,0001$) como níveis de testosterona e a idade (0,61), circunferência escrotal com a idade (0,83), circunferência escrotal os níveis de testosterona (0,47), volume testicular total com a idade (0,85), volume testicular total com os níveis de testosterona (0,56), e o volume testicular total com a circunferência escrotal (0,94).

Nos parâmetros seminais foram achadas altas correlações entre volume espermático e a concentração espermática (0,79), o vigor com a motilidade (0,68) também foram achados correlação positiva baixa entre a circunferência escrotal e a ecogenicidade (0,18) como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação entre os parâmetros de idade, biometria testicular e ecodensidade testicular de machos bubalinos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de 12 a 60 meses, no período de maio a novembro 2010.

	Idade	Testos	ECOT	CE	Vol tt	Conct	Mot	Vol	Turb	Vigor
Idade	1									
Tng ml	0.6143*	1								
ECOT	0.0340	-0.1372	1							
CE	0.8305*	0.4709*	0.1824	1						
Vol tt	0.8562*	0.5621*	0.0779	0.9471*	1					
Conct	-0.0718	-0.0304	-0.0215	0.1694	0.0193	1				
Mot	0.4007	0.1355	-0.2547	0.3065	0.4016	0.15	1			
Vol	-0.0133	-0.00001	-0.2883	0.2981	0.2035	0.7974*	0.2541	1		
Turb	0.1130	0.2304	-0.1079	0.2938	0.3375	0.3007	0.4781	0.2805	1	
Vigor	0.3231	0.0391	-0.0806	0.1608	0.2217	0.2476	0.6847*	0.1543	0.4277	1
Def tt	-0.4057	-0.1299	-0.0110	-0.3116	-0.2493	-0.2616	-0.2521	-0.2736	-0.1476	-0.2775

*($p < 0,0001$)

Idade – idade, **ECOT** – intensidade ecográfica testicular média, **CE** – circunferência escrotal, **Vol tt** – volume testicular total, **Conct** – concentração espermática, **Mot** – motilidade espermática, **Vol** – volume espermático, **Turb** – turbilhionamento, **Vigor** – vigor espermático, **Def tt** – defeitos totais.

Nos parâmetros seminais achados no nosso trabalho as altas correlações entre volume espermático com a concentração espermática foi diferente de Garcia (2009) que achou baixa correlação entre estes dois parâmetros (0,24) no entanto, foi similar com nosso trabalho com a motilidade e o vigor achando alta correlação (0.85) ($p < 0,0001$).

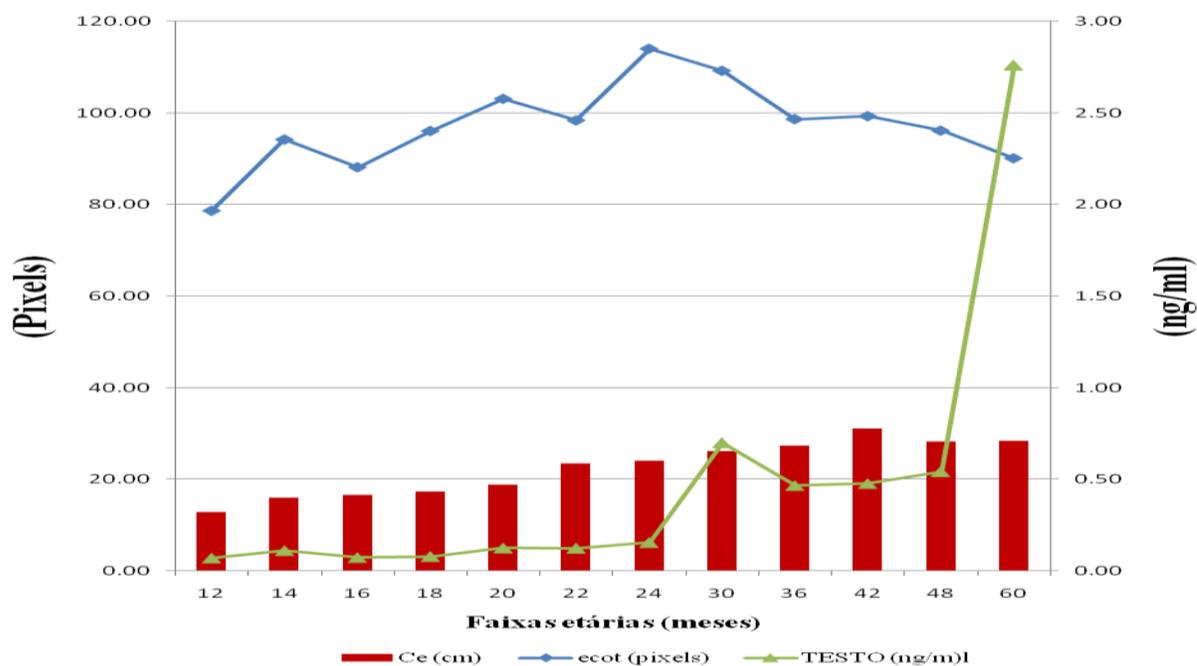


Gráfico 03 – Relação entre centímetros de circunferência escrotal, ECOT e níveis ng/ml de testosterona de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.

Em bovinos correlações entre qualidade seminal e intensidade de pixel realizadas entre imagens e amostras de sêmen coletadas no mesmo dia foi reportado por Carmo (2008) os autores reportam que não reflete o status de funcionalidade do epitélio seminífero no momento da avaliação ultra-sonográfica fato esse achado nosso trabalho onde a correlação entre os parametros seminais com a ecogenicidade todos os valores são negativos, já que dependendo da sensibilidade à injúria das células da linhagem germinativa e do transporte dos espermatozóides pelo epidídimo, alterações no epitélio seminífero só serão refletidos na qualidade do ejaculado em alguns dias ou semanas. Segundo o mesmo autor é correto afirmar que a análise das imagens ultrassonográficas dos testículos está muito mais relacionado com a qualidade de sêmen futuro do que o presente.

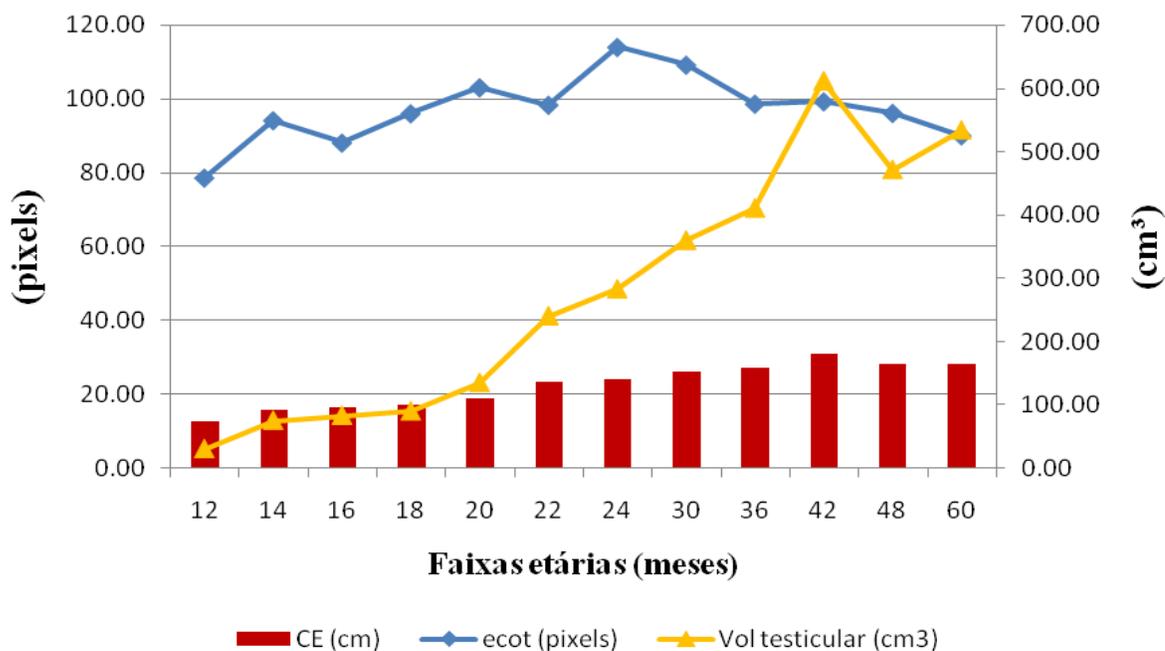


Gráfico 04 – Relação entre circunferência escrotal, volume testicular e a quantidade de pixels de 19 machos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) de acordo com a faixa etária, no período de maio a novembro 2010.

Nossos dados acharam correlações positiva baixa entre a circunferencia escrotal e a de pixels. Obsevação diferente dos dados reportados por Cartee et al. (1989) entretanto, diferente do encontrado por Gàbor et al. (1998) que encontraram uma alta correlação com a área dos túbulos seminíferos, os autores avaliaram a ecotextura do testículo e indicaram que a ultrassonografia do testículo tem um potencial considerável para a avaliação da função testicular no bovino.

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado é possível concluir que:

- A ultrassonografia é uma ferramenta eficaz para predizer as modificações ou alterações do parênquima testicular.
- As modificações de intensidade de pixel testicular foram relacionada a idade, mas não foi achado relação positiva na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual.
- Apesar de não ocorrer correlação nas modificações de ecotextura testicular com o crescimento da circunferência escrotal e o volume testicular de búfalos. Entretanto, existiu uma relação positiva entre estas variáveis na faixa etária da puberdade.
- A análise da testosterona associada as modificações na ecotextura testicular de búfalos mostrou-se eficaz na determinação da pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAZEK, A. K. H; ALI, A. Developmental Changes of Bull (*Bos taurus*) Genitalia as Evaluated by Caliper and Ultrasonography. **Reprod Dom Anim**, v. 40, p. 23–27, 2005.

AGUIAR, P. H. P. **Correlações entre circunferência escrotal, biometria testicular e aspectos físicos e morfológicos do sêmen em bubalinos adultos**. 1993. 61p. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

AGUIAR, P. H. P et al. Aspectos físicos e morfológicos e ph do sêmen de reprodutores bubalinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.48, n.3, p.325-31, 1996.

AGARWAL, S. P.; et al. Serum Testosterone And Thyroid Hormone Levels In Male Buffalo-Calves Of Different Ages. **Indian J Anim Sci**, v.53, p.609-611, 1983.

AHMAD, M.; et al. Age related changes in body weight, scrotal size and plasma testosterone levels in buffalo bulls. (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 22, p.651-656, 1984.

AHMAD, N.; et al. M. Pubertal development in male buffalo: longitudinal analysis of body growth, testicular size and serum profiles of testosterone and oestradiol bull. **Anim Reprod Sci**, n. 9, p. 161–170, 1989.

AHMAD, N.; et al. Changes in the behavior and androgenic levels during pubertal development of the buffalo bull. **Appl Anim Behav Sci**, v. 32, p. 101–105, 1991.

AHMAD, N.; et al. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Nili-Ravi buffalo bulls. **Theriogenology**, v. 73, p. 20-25, 2010.

AKSOY, M.; et al. Ultrasonographic Examination of the Scrotal Content in the Rabbit. **Reprod Dom Anim**, v. 44, p. 156–160, 2009.

AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. IIL The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. **Amer. J. Anat**, p. 110-149, 1962.

ARAVINDAKSHAN, J. P.; et al. Pattern Of Gonadotropin Secretion And Ultrasonographic Evaluation Of Developmental Changes In The Testis Of Early And Late Maturing Bull Calves, **Theriogenology**, v. 54, p. 339-354, 2000.

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.

BARBOSA, E. M. **Prevalência de Patologias no Trato Genital de Machos Bubalinos (*Bubalus bubalis*) nos Estados do Pará, Amapá e Baixo Amazonas, Brasil**. 2009. 84 f. Dissertação (mestrado em ciência animal) Universidade Federal do Pará, 2009.

BARNABÉ, V. H. Colheita e avaliação de sêmen de búfalos. In: SIMPOSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1, , 1999, Jaboticabal – SP. **Anais...funep**, 1999. v.1, p.122-125.

BASTOS, T. X.; et al. **Aspectos climáticos de Belém no últimos cem anos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 31 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 128).

BHATTACHARYA, M. K. ; KING, G. J. ; BATRA, T. R. Buffalo semen quality in various seasons. **Indian Vet. J**, v. 55, p. 591 – 594, 1978.

BHAVSAR, B. K.; DHAML, A. J., KODAGALI, S. B. Seminal characters, freezability and fertility of mehsana buffalo semen. **Indian j. Dairy Sci**, v.7, p. 7 -14, 1986.

BHOSREKAR, M. R. Studies on buffalo semen seasonal variation and effect of different diluents and freezing on sperm abnormalities. **Ind Vet J**, v. 58, p.784-789, 1993.

BHOSREKAR, M. R.; et al. Effect of different seasons on frozen semen production in murreh buffalo bulls. **Indian j Anim Sci**, v. 58, p. 1073–1074, 1998.

BONGSO, T. A.; HASSAN, M. D.; NORDIN, W. Relationship of scrotal circumference and testicular volume to age and body weight in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) **Theriogenology**, v. 22, n. 2, p.127-134, 1984.

BRASS, K. E.; et al. A ultra-sonografia no exame andrológico do Garanhão. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 13, n. 3, p. 167-172, 1989.

BRITO, L. F. C.; et al. 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.; et al. Ultrasonographic study of testicular development in young Nelore bulls raised in extensive management system. **Anim Reprod**, v. 6, n. 1, p. 252, 2009a.

CARDILLI, D. J., et al. Alterações do padrão ultrassonográfico do parênquima testicular em bovinos jovens da raça Nelore. **Actavet**, v. 37, n. 4, 2009b.

CARDILLI, D. J.; et al. Padrão Ultrassonográfico Do Parênquima, Mediastino e Túnicas Testiculares Em Bovinos Jovens Da Raça Nelore. **Ci. Anim. Bras**, v. 11, n. 4, p. 899-905, 2010.

CARMO, A. S do. **Avaliação do desenvolvimento testicular de machos da raça guzerá do nascimento aos 30,0 meses de idade, através da ultra-sonografia, biometria e avaliação espermática**. 2008. 87 F. Dissertação (mestrado em ciência animal)-universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

CARTEE, R. E.; et al. Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. **Am J Vet Res**, v. 47, p. 2543-2548, 1986.

CARTEE, R. E.; et al. Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. **Theriogenology**, v. 31, n.6. p. 1149-1157, 1989.

CARTER, A. P.; WOOD, P. D. P.; WRIGTH, P. A. Association between scrotal circumference, live weight and sperm output in cattle. **J Reprod Fertil**, v.59, p. 447-451, 1980.

CEROVSKY, J. A New Staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p. 351-362, 1976.

CHACUR, M. G. M. **Estresse térmico em touros bufalinos *bubalus bubalis*, avaliações das características fisiológicas da reprodução**. 1999. 126f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 1999.

CHAUDHARY, K. C. ; GANGWAR, P. C. seasonal variation in physical biochemical determinants of buffalo (*bubalus bubalis*) semen and their relation to fertility. **J.Agric. Sci**, v. 89, p. 273 – 277, 1977.

CHAPWANYA, A.; et al. Breeding soundness evaluation of bulls by semen analysis, testicular fine needle aspiration cytology and trans-scrotal ultrasonography. **Irish Veterinary Journal**, v. 61, n. 5, p. 315-318, 2008.

CHANDOLIA, R. K.; et al. Ultrasonography Of The Developing Reproductive Tract In Ram Lambs: Effects Of A GnRh Agonist. **Theriogenology**, v. 48, p. 99-117, 1997a.

CHANDOLIA, R. K.; et al. Assessment of development of the testes and accessory gland by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v. 48, p.119–132, 1997b.

CHANTARAPRATEEP, P.; et al. Circadian variations of plasma LH and testosterone in adult swamp buffalo bulls. **Theriogenology**, v. 15, n. 2, p. 161-172, 1981.

COULTER, G. H., LARSON, L. L.; FOOTE, R. H. Effect of age on testicular growth and consistency of Holstein and angus bulls. **J Anim Sci**, v. 41, p.1383-1389, 1975.

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, 1988.

COIMBRA, A. S. **Características Seminais De Touros Bovinos Zebuínos (*Bos Tauros Indicus*), Taurinos (*Bos Taurus Taurus*) e Bubalinos (*Bubalus Bubalis*), Doadores De Sêmen Em Condições De Tropicó Úmido Amazônico**. 2002. 78 F. Dissertação (mestrado em ciência animal)-universidade Federal do Para, 2002.

CURTIS, S. K.; AMANN, R. P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **J Anim Sci**, v. 53, p. 1645-1657, 1981.

Disponível em: <http://www.voudemochila.com.br/map_c/belem.jpg> acesso em: 23 de maio 2011.

ELWISHI, A. B. reproductive performance of Iraqi buffalos. Seasonal variation in sexual desire and semen characteristics. **Egypt. J Vet. Sci**, v. 13, p. 28 – 32, 1976.

ESCRIVÃO, S. C.; et al. Patologia do sistema genital na espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v. 29, n.2, p.74-76, abril/jun. 2005.

EVANS, A. C. O.; et al. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. **Theriogenology**, v. 43, p. 569-578, 1995.

EVANS, A. C. O.; et al. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 46, p.345-357, 1996.

FIELDS, M. J. ; BURNS, W. C. ; WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **J Anim Sci**, v. 48, p. 1229-1334, 1979.

FISHER, H. ; BODHIPAKSHA, P. Reproduction in swamp buffaloes. In: Tulloh, NM (Ed.). **Buffalo production**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers, p.153-169, 1992.

GABOR, G.; et al. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, v. 50, P. 223-228, 1998.

GARCIA, O, S. **Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos**. 2009. 68 F. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Para, 2009.

GANGULI, N. C. problems of long-term semen preservation. In: WORLD BUFFALO CONGRESS. 2., 1988, New Delhi. **Anais...** New Delhi, 1988. P. 244 – 253.

GILL, R. S.; GANGWAR, C.; TAKKAR, O. P. Seminal attributes in buffalo bulls as affected by different seasons. **Indian j. anim. Sci**, v. 44, p. 415 – 418, 1974.

GUNARAJASINGAM, D.; et al. Testosterone secretion in Young and adult buffalo bulls. **Theriogenology**, Stonehan, v. 24, n. 2, p. 185-195, 1985.

HAHN, J.; FOOTE, R. H. ; SEIDEL, G. E. J. R. Testicular growth and sperm output in dairy bulls. **J. Anim. Sci**, v. 29, p.41-47, 1969.

HAHN, J.; STOUFFER, J. R.; FOOTE, R. H. Ultrasonographic and Other Testicular Characteristics of Holstein Bulls Revisited. **J. Reprod. Dev**, *Ithaca* v. 45, n. 6, p. 405–410, 1999.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

HILDEBRANDT, T. B.; et al. Ultrasonography As An Important Tool For The Development And Application Of Reproductive Technologies In Non-Domestic Species. **Theriogenology**, v.53, p. 73-84, 2000.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, E, S, E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Barueri, Brasil: manole, 2004, p. 159-171.

JUCÁ, A. de F. **Avaliação ultra-sonográfica dos testículos e das glândulas sexuais acessórias de ovinos da raça Santa Inês** 2005, 94p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) - Universidade Federal da Bahia, 2005.

KOONJAENAK, S. **Semen and Sperm Characteristics of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bulls for Artificial Insemination in Thailand, in Relation to Season**. 2006. 50 F. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2006.

LLAURADO, J. G.; DOMINGUEZ, O. V. Effect of cryptorchidism on testicular enzymes involved in androgen biosynthesis. **Endocrinology**, v.72, p. 292, 1963.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, v. 50, p. 955-972, 1998.

MCCOOL, C. J.; ENTWISTLE, K. W.; GILHAM, M. P. Testis growth rates in the Australian swamp buffalo. **Buf J**, v. 1, p. 2936, 1985.

MCCOOL, C. J.; ENTWISTLE, K. W. The development of puberty and sexual maturity in the Australian Swamp Buffalo Bull. **Theriogenology**, p. 32, p. 171–84, 1989.

MELO, M. I. V.; et al. Aspectos endócrinos e testiculares de búfalos, do nascimento até 12 meses de idade. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, n.1, p.151-152, 1989.

MELO, M. I. V. **Desenvolvimento testicular e dinâmica da espermatogênese de búfalos mestiços de 10 a 24 meses de idade.** 1991. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 1991.

MELO, M. I. V.; VALE FILHO, V. R. Análise quantitativa do processo espermatogênico de búfalos jovens. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.17, n3-4, p.75-80, 1993.

MONTES, I.; PÉREZ, I.; MARTINTO, J. G. Desarrollo Corporal Y Testicular Del Búfalo Hasta Los 11 Meses De Nacidos En Cuba **ciencia y tecnología ganadera**, v. 1, n. 1-2, p. 35-40, 2007.

MOURA, J. C. de.; MERKT, H. **A ultrasonografia na reprodução eqüina.** 2 ed Salvador: Editora Universitaria Americana, 1996. 162p.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Aspectos Reprodutivos do Macho Bubalino. In: **Bubalinos: Fisiologia e Patologia da Reprodução.** Campinas: Cargill, p. 69-86, 1988.

OHASHI, O. M. **Estudo morfológico do testículo de búfalos mestiços (*Bubalus bubalis*) em diferentes idades.** 1993.111f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 1993.

OHASHI, O. M.; et al. Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinología. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.299-306, jul./set. 2007.

PACHECO, A.; et al. Avaliação da biometria testicular em Búfalos jovens criados na região Norte do Rio de Janeiro In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 15. 2005, Campo Grande-MS. **Anais...** Campo Grande, Congresso Brasileiro de Zootecnia 2005. mrp-116.

PASTORE, A. de. A. **Contribuição da ultra-sonografia na avaliação andrológica de bovinos Nelore.** 2008, 63 F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal, 2008.

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

PEREIRA, R. G. de A.; et al. **Eficiência reprodutiva de búfalos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007. 15 p. (Documentos/ Embrapa Rondônia).

PERERA, B. M. A. O.; et al. Seasonal differences in plasma testosterone profiles in buffalo bulls. **Theriogenology**. Stonehan, v. 12, n.1, p. 33-38, 1979.

PUGH, C. R.; KONDE, L. J.; RARK, R. D. Testicular ultrasound in the normal dog. **Vet. Radiol**, v. 31, p.195-199, 1990.

RAJAMAHENDRAN, R. Characteristics and preservation of semen in buffalo bulls and the use of hormone in buffalo females. *Sarec. Rep. Biol*, p. 111 – 118, 1982.

RASBAND, W. S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.

RIBEIRO, H. F. L. Aspectos reprodutivos de bubalinos criados na região Amazônia. **Revista de Ciências Agrárias**. Belém, 2006. n. 45 (Suplemento).

RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Dag defect in murrh buffalo bulls in Brazil. **Italian J. Anim. Sci**, v. 6, n. 2, p. 667-670, 2007.

SÁNCHEZ-CARBAYO M.; et al. Elecsys testosterone assay evaluated. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1744 – 1746, 1998.

SARTORI, R.; et al. Avaliações Ultra-Sonográfica, Macroscópica E Histológica Da Biopsia Testicular Em Ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 54, n.3, Belo Horizonte, 2002.

SHARMA, I. J.; et al. Changes in profiles of serum sex steroids of male buffaloes from birth to maturity. **Theriogenology**, Stonehan, v. 22, n. 2, p. 175- 186, 1984.

SINGH, B. ; SHADY, D. P. Concentration of fructose in buffalo semen and Glycolysis and oxygen uptake os buffalo spermatozoa compared to those os the zebu in relation to climatic environment. **Indian J. Vet. Med**, v. 5, p. 296 – 303, 1978.

SOUSA, J. S.; et al. Biometria do sistema genital de bufalos - bubalus bubalis. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 4, n. 3-4, p. 66-74, 1980.

SOUSA, J. S.; et al. Seasonal characteristics of buffalo semen in the amazon region. In: PROCEEDINGS OF THE 4 SIPAR FOLLOW-UP SEMINAR ON ANIMAL REPRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY FOR LATIN AMÉRICA, 4., 1998, Castanhal. **Anais...** castanhal, 1998. p. 82 – 87.

VALE FILHO, V. R.; et al. Patologia do sêmen. In: **Diagnóstico andrológico e classificação do *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil** – De um estudo em 1088 touros. II Prêmio Dow de Veterinária, São Paulo, p. 54. 1978.

VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em Touros: Parâmetros Para Avaliação Andrológica e Conceitual Geral. **Cad. Tec. Vet. Zootec**, v. 35. P. 81-87, 2001.

VALE, W. G.; et al. Biometria do Sistema Genital Masculino de Búfalos (*Bubalus bubalis*) abatidos em matadouro. I Testículo e Epidídimo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. 16 1978. Salvador-BA. **Anais...**Salvador: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. 1978.

VALE, W. G. Collection processing and deep freezing of buffalo semen. **Buffalo J**, v.2, supp. 1, p. 65-81, 1994.

VALE, W. G. Sperm Cryopreservation. Third Course on Biotechnology of Reproduction In Buffaloes, Caserto, Italy. In: *Bubalus bubalis*. **Journal Buffalo Science and Technique**, suppl. 4, p.129 – 140, 1997.

VALE, W.G.; et al. Relationship of age, bodyweight and scrotal circumference in Murrah buffalo bulls. In: WORLD BUFFALO CONG, 6., 2001, Maracaibo. **Anais...** Maracaibo: World Buffalo Cong, 2001. v. 2, p 256-262.

VALE, W. G.; et al. Arrested development of the mesonephric ducts in a Murrah buffalo bull. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1^o 2002 Belém. **Anais...**Belém: Buffalo Symposium of Americas. 2002, p. 479-81.

VALE, W. G.; et al. Testis growth, body weight and testicular size rates in the Brazilian murrah buffaloes. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil. **Abstracts ...** Porto Seguro: ICAR, 2004. v.1, p.179.

VALE, W. G. Application of reproductive techniques in buffalo. In ASIAN BUFFALO CONGRESS ON SOCIAL ECONOMIC CONTRIBUTION OF BUFFALO TO RURAL AREAS, 5, 2006. Nanning, China. **Proceedings...** Nanning. April 18 -22, v.1, p. 140–154.

VALE, W. G.; et al. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.141-155, abr./jun. 2008.

VASCONCELOS, C. O. P.; et al. Estágio de maturidade sexual em touros da raça Nelore, dos 20 aos 22 meses de idade. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v. 27, n. 2, 2003.

VIANA, R. B. **Influência da suplementação mineral sobre o desenvolvimento reprodutivo de búfalos do desmame aos 24 meses de idade.** 2006. 201f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)-Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2006.

VIDAL, S. C.; VALE, W. G. Estudo da Libido e do comportamento sexual de búfalos com o sêmem colhido através de vagina artificial In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA e SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 6 e 12. 2008. Belém -PA. **Resumo...**Belém.2008.

VILLARES, J. B. ; RAMOS, A. A. ; ROCHA, G. P. biometria testicular de búfalas Jaffarabadi, Murrah e Mediterrâneo nos trópicos. In: RAMOS, A. de A. ; VILLARES, J. B.; MOURA, J. C. **Bubalinos.** Campinas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, 1979. P.133-46.

ZAVA, M. A. R. A. **Produção de búfalos.** Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984.