

Características seminais de ovinos suplementados ou não com uréia e diferentes fontes de enxofre

Thais Rose dos Santos
HAMILTON¹
Carlos de Sousa LUCCI²
Ed Hoffmann MADUREIRA¹
Suelen NARIMATSU²
Rodrigo Hayashi GOULART²
Jefferson GIL²
Valter FONTOLAN²
Marcos Sampaio
BARUSELLI³

1 – Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP
2 – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro, São Paulo - SP
3 – Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, São Paulo – SP

Correspondência para:

Thais Rose dos Santos, Rua Salvador Nascimento, 176, Jardim Bonfiglioli – Butantã, 05363-110 – São Paulo – SP, tharose@usp.br/thaisroseh@hotmail.com

Recebido para publicação: 22/03/2007
Aprovado para publicação: 30/10/2008

Resumo

Doze carneiros machos adultos mestiços Santa Inês de mesma idade e porte semelhante foram empregados em um delineamento inteiramente casualizado, por um período experimental de 60 dias. Os animais foram distribuídos para três tratamentos: A. 100% das exigências em proteína degradável no rúmen (controle); B. 100% das exigências em proteína degradável no rúmen + 3% de uréia + enxofre (99% S) e C. 100% das exigências em proteína degradável no rúmen + 3% de uréia + enxofre quelatado (21,5% S). Semanalmente foram colhidas amostras de sêmen obtidas com emprego de vagina artificial e de sangue para determinação da concentração de nitrogênio uréico plasmático, assim como realizadas pesagens dos animais e aferições de circunferência escrotal. No sêmen foram analisados: volume e turbilhonamento; vigor, motilidade e concentração espermática; total de espermatozoides e total de espermatozoides viáveis no ejaculado; integridade de membrana e de acrossoma; morfologia espermática e concentração de nitrogênio uréico no plasma seminal. Os animais suplementados com uréia apresentaram níveis de N-uréico no plasma sanguíneo e seminal significativamente maiores que os encontrados nos do tratamentos controle ($p < 0,05$). Houve diferença significativa entre as fontes de enxofre utilizadas ($p < 0,05$) quanto às características do sêmen estudadas, o tratamento C apresentando valores maiores para turbilhonamento (4,57), motilidade espermática (85,69%), vigor espermático (4,66) e total de espermatozoides por ejaculado ($9,02 \times 10^9$), além de uma porcentagem inferior de defeitos menores (5,37%) quando comparado ao tratamento B.

Palavras-chave:

Carneiros.
Reprodução.
Nutrição.
Sêmen.
Nitrogênio não protéico.

Introdução

O emprego da uréia como suplemento alimentar para reprodutores é evitado por muitos pecuaristas devido ao receio de causar prejuízo à fertilidade. Esta situação, amplamente discutida na literatura para as fêmeas bovinas¹, tem escassas informações quanto se trata dos machos.

A influência do nível de alimentação nitrogenada na capacidade de produção de espermatozoides pelos tecidos testiculares de carneiros interfere na alta sensibilidade desses tecidos às condições de nutrição inferiores ou superiores às exigências², sendo que a

capacidade dos carneiros em produzir espermatozoides pode ser estimada através da mensuração dos testículos.

Os carneiros com grande capacidade de serviço apresentaram valores maiores para: quantidade de espermatozoides, pesos testiculares e pesos vivos. Os animais que são continuamente utilizados para coberturas apresentam espermatozoides não totalmente maduros nos ejaculados, o que poderia resultar em menores taxas de fertilização.³

Há resultados contraditórios em experimentos que testaram o efeito da suplementação protéica que talvez tenham sido decorrentes de formulações onde

proteína bruta digestível é usada na maioria dos experimentos; o parâmetro ideal para os ruminantes deveria considerar a degradabilidade da proteína e a formação de proteína microbiana no rúmen.⁴

Existe um período de seis a sete semanas para obter-se resposta em número de espermatozóides devida às alterações na dieta, refletindo o tempo necessário para o desenvolvimento das espermátides (no epitélio germinativo) em espermatozóides completamente adultos na cauda do epidídimo.⁵

O tamanho testicular e a produção de espermatozóides podem ser afetados por ingestão de proteína acima dos requerimentos de manutenção.⁶ A espermatogênese em carneiros é sensível ao aumento de ingestão protéica, já que há um incremento no volume e diâmetro dos túbulos seminíferos.^{2,7}

Melhora no desempenho reprodutivo é observado quando os carneiros foram suplementados com dietas contendo alta concentração de proteína.^{6,8} Em cabritos, foi observado incremento dos pesos vivos e do tamanho testicular, adiantamento da puberdade, melhora dos índices de fertilidade, como volume seminal, motilidade espermática e concentração quando se utilizou maiores níveis de proteína bruta nas rações.⁹

Foi observado aumento nas células espermáticas e das características físico-químicas do sêmen quando carneiros foram alimentados com palha de arroz tratada com 3% de amônia, comparados aos recebendo palha de arroz sem tratamento.¹⁰ Ovinos machos alimentados com dietas contendo uréia apresentaram melhora nas características físicas do sêmen, e decréscimo das patologias espermáticas, especialmente dos defeitos menores.¹¹

Os animais que receberam suplementação na dieta acima de 300g de silagem de folha de *Leucaena leucocephala* por dia (leguminosa, fornece aproximadamente 24% de proteína bruta na matéria seca, muito utilizada durante as estações secas na América Central), apresentaram aumento de ingestão alimentar, do crescimento testicular, da produção de espermatozóides e da

qualidade do sêmen.¹²

Contrariamente, utilizando aproximadamente 2% de uréia na ração total como fonte de nitrogênio para carneiros verificaram-se menores valores para motilidade e concentração espermática, e ainda maior porcentagem de espermatozóides mortos e anormais em indivíduos suplementados em relação ao tratamento controle¹³. No entanto, este mesmo nível de nitrogênio na dieta de carneiros adultos, afetou de maneira linear e direta os teores de uréia no plasma sanguíneo e seminal, sendo que esta suplementação não alterou a viabilidade ou integridade estrutural dos espermatozóides^{14,15} e as produções de frutose, ácido cítrico, enzima fostatase ácida, teores das enzimas intracelulares e congelabilidade dos espermatozóides¹⁵, nem os parâmetros citogenéticos¹⁴.

Altas ingestões protéicas, acima das necessidades de manutenção (cerca de 12 gramas de proteína bruta digerida nos intestinos a cada 100 gramas de matéria orgânica), não são essenciais para as altas produções de espermatozóides em carneiros¹⁶, embora a ingestão energética pareça ter um grande efeito na produção de espermatozóides.

Quando é utilizado NNP (nitrogênio não protéico) na dieta, é importante considerar a suplementação de enxofre que participa diretamente da síntese de aminoácidos sulfurados (metionina, cistina e cisteína) e de outros compostos sulfurados¹⁷. A utilização de NNP é prejudicada por baixos níveis de enxofre no fluido ruminal, reduzindo o crescimento microbiano e o desempenho dos animais.¹⁸

Recomenda-se 0,14 a 0,26% de enxofre na alimentação de ovinos, sendo para animais jovens entre 0,18 – 0,26% e para adultos entre 0,14 - 0,18%¹⁹, a relação nitrogênio da uréia:enxofre recomendada varia de 12:1 a 10:1 para garantir produção de proteína¹⁷.

Complexos organo-minerais tem elevado índice de absorção entérica, e assim biodisponibilidade superior em relação às fontes inorgânicas.²⁰ A adição de minerais

quelatados na dieta de bovinos é capaz de melhorar o crescimento, a produção leiteira, os parâmetros reprodutivos e imunológicos, graças a melhor biodisponibilidade que apresentam.²¹

Os objetivos deste trabalho foram estudar os efeitos da adição de enxofre, nas formas inorgânica e orgânica (quelatada), em rações ricas em uréia procurando observar possíveis alterações nos níveis de nitrogênio uréico nos tecidos reprodutivos de ovinos machos e as conseqüências advindas desta ação sobre a qualidade do sêmen.

Material e Método

O experimento foi realizado em Centro Experimental ligado à Universidade de Santo Amaro, situado em Piedade (Latitude 23°42'43" Sul e a uma Longitude 47°25'40" Oeste, estando a uma altitude de 781 metros do nível do mar), São Paulo. Foi executada uma fase de adaptação dos animais às dietas, de aproximadamente 60 dias, após serem atingidos níveis sanguíneos de nitrogênio uréico superiores em 20% aos presentes nos animais controle. A adaptação às dietas por 60 dias corresponde a um ciclo espermático.

Foram empregados doze carneiros machos adultos com idade aproximada de 14 meses, mestiços Santa Inês, de porte semelhante. As dietas eram isoenergéticas, diferindo apenas quanto aos níveis de nitrogênio nos grupos suplementados com uréia, assim como no tipo de enxofre utilizado, formando-se os tratamentos seguintes:

A. 100% das exigências em proteína degradável no rúmen (controle); B. 100% das exigências em proteína degradável no rúmen + 3% de uréia + enxofre inorgânico (99% de enxofre); C. 100% das exigências em proteína degradável no rúmen + 3% de uréia + enxofre quelatado (21,5% de enxofre).

A ração fornecida era composta por: 50% de farelo de milho, 12% de farelo de soja, 10% de farelo de trigo, 3% de sal mineral para ovinos e 25% de feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) picado. Com 85,57% de matéria seca total fornecia 13,52% de proteína bruta, 4,14% de extrato etéreo, 57,49% de extrativo não nitrogenado, 9,28% de fibra bruta, 6,79% de fibra em detergente ácido e 15,57% de matéria mineral.²²

As quantidades fornecidas aos animais de acordo com os tratamentos encontram-se no quadro 1. Os animais que receberam

INGREDIENTES	Ingestão em Gramas		
	A	B	C
Farelo de milho (8% PB)	600	600	600
Farelo de soja (46% PB)	144	144	144
Farelo de trigo 15% PB)	120	120	120
Feno de Coast-Cross (7% PB)	300	300	300
Sal Mineral	36	36	36
Uréia (240% EP)	0	36	36
Enxofre inorgânico	0	1,8	0
Enxofre orgânico	0	0	8,4
Total (g)	1200	1237,8	1244,4
INGREDIENTES	Gramas de Equivalente Protéico		
	A	B	C
Farelo de milho (8% PB)	48	48	48
Farelo de soja (46% PB)	66,24	66,24	66,24
Farelo de trigo 15% PB)	18	18	18
Feno de Coast-Cross (7% PB)	21	21	21
Uréia (240% EP)	0	86,4	86,4
Total de EP (g)	153,24	239,64	239,64

Quadro 1 - Ingestão dos alimentos / minerais e ingestão de equivalente protéico (EP), quantidades fornecidas em gramas/animal/dia para os diferentes tratamentos. Equivalente protéico em gramas/animal/dia – São Paulo – 2007

os tratamentos B e C tiveram um aumento de 56 % na ingestão de equivalente protéico.

As quantidades de ração fornecidas atenderam as necessidades de manutenção.¹⁹

A ração foi oferecida três vezes ao dia, sendo as quantidades de uréia e de enxofre adicionadas nos momentos da alimentação.

Semanalmente, foram aferidas as circunferências escrotais e realizadas colheitas de sêmen em vagina artificial para ovinos, utilizando-se uma fêmea não necessariamente em estro, como manequim. O período experimental foi de 60 dias, correspondente a um ciclo espermático, totalizando nove colheitas por animal, com intervalos de uma semana. As amostras de sêmen prestaram-se para as provas: volume seminal (mL), vigor (1-5), motilidade (%), turbilhamento (0-5).²³ A motilidade foi representada pela porcentagem de espermatozóides com movimentação retilínea e progressiva num determinado campo microscópico. Considerou-se vigor a velocidade de deslocamento retilíneo progressivo individual dos espermatozóides. As determinações dos valores de turbilhamento representaram a motilidade de massa.

Foi realizado o cálculo de concentração espermática (número de espermatozóides/mL).^{14,15} O total de espermatozóides por ejaculado foi estimado multiplicando-se o volume ejaculado pela concentração de espermatozóides; o total de espermatozóides viáveis por ejaculado multiplicando-se o total de espermatozóides por ejaculado pela porcentagem de espermatozóides móveis.

A avaliação da integridade da membrana e do acrossoma dos espermatozóides foi efetuada pela técnica Trypan-blue/Giemsa.^{24,25} Durante as leituras os espermatozóides eram classificados em quatro categorias: vivos com acrossomo intacto (VAI); vivos com acrossomo lesado (VAL); mortos com acrossomo intacto (MAI) e mortos com acrossomo lesado (MAL). Os resultados foram expressos em porcentagens, considerando as médias de 400 células lidas

no total, sendo 200 células por lâmina e duas lâminas por animal por ejaculado.

A morfologia espermática foi estudada com diluição de 20ul de sêmen fresco em 2 ml de formol salino tamponado. As amostras foram avaliadas em preparação úmida, com microscópio de contraste de interferência e diferencial – Nikon Eclipse 80i, sob aumento de 1000 vezes - imersão. Foram avaliados 200 espermatozóides por amostra, e classificados em defeitos menores, maiores e total de anomalias.²⁶

Para determinar a concentração da uréia (plasma sanguíneo e seminal) foi empregado o método enzimático colorimétrico^{14,15}, kit comercial (Uréia CE enzymatica colorimetric assay), pesos corporais de todos os animais foram verificados semanalmente, sempre no mesmo horário (pela manhã, antes da primeira refeição).

O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, onde cada animal e número de ejaculados avaliados constituíram-se em observação, empregando-se o teste de Tukey para comparação de médias de tratamentos²⁷ ($\alpha = 0,05$).

Resultados e Discussão

Os resultados estão apresentados na tabela 1. Os resultados referentes às concentrações de N-uréico foram cerca de 20% e 35% mais elevados no sangue e no sêmen respectivamente, nos tratamentos com suplementação de uréia em relação ao sem uréia, mas entre tratamentos suplementados por uréia não foram detectadas diferenças. Resultados semelhantes aos encontrados na literatura quando também foi estudado o perfil plasmático sanguíneo e seminal de ovinos suplementados na dieta com uréia.^{10, 28}

Os valores encontrados para concentração espermática em número de espermatozóides / ml (1×10^9), estão em conformidade com os relatados para carneiros adultos de diferentes raças.²⁹ Considera-se concentração espermática normal em sêmen de ovinos, aqueles que apresentem, no mínimo, 1×10^9 espermatozóides / ml.³⁰

Os resultados deste trabalho

Tabela 1 - Valores de probabilidade estatística (p), coeficientes de variação em porcentagem (CV) e médias para nitrogênio uréico no sangue e sêmen, e características seminais, encontrados nos diferentes tratamentos empregados - São Paulo - 2007

VARIÁVEIS	p	CV	A	B	C
Uréia sangue (mg/dl)	0,0087	15,51	16,47 ^a	21,01 ^b	25,99 ^b
Uréia sêmen (mg/dl)	0,0019	15,11	8,91 ^a	13,99 ^b	15,88 ^b
Volume Seminal (ml)	0,2373	20,81	1,59	1,21	1,39
Turbilhonamento (0-5)	0,0324	9,51	4,5 ^{a,b}	3,74 ^b	4,57 ^a
Motilidade Espermática (%)	0,0355	5,94	83,89 ^{a,b}	75,5 ^b	85,69 ^a
Vigor Espermático (1-5)	0,0334	6,8	4,54 ^{a,b}	4,02 ^b	4,66 ^a
Concentração Espermática (x10 ⁹ spztz/ml)	0,1227	21,54	5,06	3,99	5,71
Circunferência Escrotal (cm)	0,1627	7,31	33,05	33,06	33,14
PesoVivo (kg)	0,0733	9,14	66,7	66,12	57
Defeitos maiores (%)	0,5085	85,28	2,34	4,47	2,65
Defeitos menores (%)	0,0394	44,16	6,38 ^{a,b}	12,57 ^b	5,37 ^a
Total anomalias (%)	0,1378	54,55	8,73	16,66	8,03
Total de espermatozoides/ejaculado (x10 ⁹)	0,0459	26,51	7,86 ^{a,b}	5,05 ^b	9,02 ^a
Total spztz viáveis/ejaculado (x10 ⁹)	0,0944	32,38	6,5	3,88	6,91
VAI (%)	0,1283	8,89	69,9	60,85	67,65
VAL (%)	0,3038	27,82	2,13	2,96	2,58
MAI (%)	0,8056	18,8	6,64	6,28	6,09
MAL (%)	0,1267	21,26	21,13	29,35	23,43

Total de anomalias = Defeitos Maiores + Defeitos Menores (%)

concordam com os apresentados por autores que também utilizaram uréia como fonte de suplementação^{14,15}, que não encontraram alterações na concentração espermática quando utilizaram uréia como fonte de suplementação nitrogenada. Contudo, outros pesquisadores^{12,31} registraram valores superiores para concentração espermática, em animais que receberam suplementação protéica. Por outro lado a utilização de uréia como fonte de nitrogênio na alimentação em carneiros também pode diminuir os valores de concentração espermática.^{8,13}

Neste estudo, os valores obtidos para concentração e total de espermatozoides viáveis, apresentaram valores mais elevados para os animais recebendo uréia e enxofre quelatado (tratamento C) quando comparado ao tratamento B, fato detectado como estatisticamente significativo, apesar da alta variabilidade comum a este tipo de material e a ocorrência de masturbação freqüente em quase todos os animais pertencentes aos tratamentos B e C, neste experimento. Touros sob dietas com muita proteína a masturbação é fenômeno comum como resultado da

mucosa externa do pênis tornar-se mais sensível à estimulação táctil.³²

Os valores de volume seminal obtidos para os tratamentos foram maiores que os encontrados na literatura^{12,14} independente da suplementação nitrogenada.

São descritos na literatura, volumes que variam de 0,5³⁰ a 1,1³³ mL. Os resultados deste experimento apresentaram médias superiores às necessárias para caracterizar um macho ovino adulto apto à reprodução e estão em conformidade com os obtidos para ovinos.^{23,29,32,33}

O efeito da suplementação de uréia nas variáveis seminais de touros e na fertilidade em carneiros já foi descrito na literatura¹¹, onde não foi observado nenhum tipo de prejuízo nas características seminais e na fertilidade, dados concordantes com o presente experimento. No entanto, outro trabalho, ao utilizar uréia como fonte de nitrogênio na alimentação de carneiros, a motilidade e a concentração espermática apresentaram-se menores, assim como o aumento das porcentagens de espermatozoides mortos e anormais no grupo suplementado com

uréia¹³, diferentes daqueles do presente experimento.

As porcentagens de espermatozóides móveis nos grupos que receberam suplementação foram próximas as de 70%, dado já registrado em literatura¹³, porém há relatos de motilidade menor que 70% quando há utilização de uréia na dieta de ovinos¹⁴; os valores de turbilhonamento encontrados neste experimento foram semelhantes aos descritos quando carneiros receberam uréia na dieta⁸, no entanto este resultado pode variar, uma vez que há descrição de valores menores quando se utilizou a mesma suplementação¹⁴, tanto para turbilhonamento quanto para vigor espermático. No que se refere aos valores obtidos sobre integridade de membrana e acrossoma, os resultados são ligeiramente maiores que os encontrados na literatura para bovinos e caprinos³⁴, no entanto as porcentagens de espermatozóides vivos sem reação acrossomal são menores que o descrito para ovinos^{35,36}; ou seja, neste experimento os níveis aumentados de uréia na dieta não prejudicaram a morfologia espermática e a função dos espermatozóides.

O decréscimo das patologias espermáticas observadas neste trabalho, especialmente de defeitos menores, também é relatado na literatura quando ruminantes receberam suplementação com nitrogênio não protéico.¹¹ Os volumes testiculares e pesos vivos, dados altamente relacionados entre si² não apresentaram diferenças entre tratamentos, assim como encontrado na literatura.⁸ As medições de circunferências escrotais encontram-se na faixa normal de ovinos^{30,33}, mas diferiram dos encontrados de outros autores que encontraram médias menores para carneiros suplementados na dieta com uréia^{12, 14, 18, 29}. No entanto, também há relatos de dados semelhantes aos deste experimento.^{33,37} Essa diferença encontrada na literatura pode ser justificada pela idade dos animais.

Houve melhora no ganho de peso e da conversão alimentar quando bovinos de corte receberam enxofre quelatado na suplementação mineral³⁸, o que indica

maior biodisponibilidade do mineral quelatado. Neste experimento constatou-se que o tratamento C, que recebeu o enxofre quelatado, apresentou melhores características seminais, quando comparado ao tratamento B: houve diferença significativa entre as fontes de enxofre utilizadas ($p < 0,05$), apresentando valores maiores para turbilhonamento ($4,57 \times 3,74$), motilidade espermática ($85,68\% \times 75,5\%$), vigor espermático ($4,66 \times 4,02$) e total de espermatozóides por ejaculado ($9,02.10^9 \times 5,05.10^9$), além de uma porcentagem inferior de defeitos menores ($5,37\% \times 12,57\%$).

Estes resultados indicam ser o quelatado mais eficiente no metabolismo de uréia, caracterizando melhora das características seminais de ovinos quando suplementados na dieta com uréia e enxofre quelatado.

Conclusões

1. Condições de alta suplementação alimentar com nitrogênio não protéico incrementam, de forma evidente, as concentrações de N-uréico no plasma sanguíneo e seminal.

2. A administração de uréia na alimentação associada à suplementação com enxofre quelatado proporciona maiores valores para turbilhonamento, vigor espermático, motilidade espermática e número total de espermatozóides por ejaculado; e ainda diminui a porcentagem de defeitos no sêmen, em comparação à suplementação do enxofre inorgânico.

3. As características seminais estudadas não indicaram qualquer alteração desfavorável quando carneiros foram expostos a quantidades de nitrogênio não protéico alimentar superiores aquelas usualmente adotadas.

Agradecimentos

À Universidade de Santo Amaro e à Tortuga Companhia Zootécnica Agrária.

Seminal characteristics of rams supplement or not with urea and two sources of sulphur

Abstract

Twelve adult Santa Inês crossbred rams with similar weight and age employed in a randomized design for 60 days period to evaluate three treatments: A. 100% of degradable protein requirement (control); B. 100% of degradable protein requirement + 3% urea + inorganic sulphur (99%S) and C. 100% of degradable protein requirement + 3% urea + organic sulphur (21,5% S). Every week seminal collections were made through artificial vagina; blood collections were made to analyze plasma N-ureic levels and measured live weight and scrotal circumference. In semen samples were studied volume, microscopic waves, vigor, motility, concentration, total sperm per ejaculate, total feasible sperm per ejaculate, membrane sperm integrity, acrosomal integrity, percent of abnormal spermatozoa and N-ureic level in seminal plasma. Treatments experimental animals receiving presented blood and seminal plasma N-ureic levels higher than the ones of control treatment ($p < 0,05$). There was significant difference between organic and inorganic sources of sulphur in the following semen characteristics ($p < 0,05$): treatment C presented microscopic waves (4,57), motility (85,69%), vigor (4,66) and total sperm per ejaculate ($9,02 \times 10^9$) higher than treatment B; and the percentage of secondary sperm abnormality (5,37%) was lower than treatment B.

Key words:

Sheep.
Reproduction.
Nutrition.
Semen.
Nonprotein nitrogen.

Referências

- 1 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 th. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 406 p.
- 2 OLDHAM, C. M.; ADAMS, N. R.; GHERARDI, P. B.; LINDSAY, D. R.; MACKINTOSH, J. B. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 1, p. 173-179, 1978.
- 3 BARWICK, S. A.; KILGOUR, R. J.; FOWLER, D. G.; WILKINS, J. F.; HARVEY, W. R. Ram mating performance in Border Leicesters and related breed types. 3. Relationships of ram serving capacity, testis diameter, liveweight, breed and age with flock fertility. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 29, n. 1, p. 17-22, 1989.
- 4 LINDSAY, D. R.; PELLETIER, J.; PISSELET, C.; COUROT, M. Changes in photoperiod and nutrition and their effect on testicular growth of rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, n. 2, p. 351-356, 1984.
- 5 ROBINSON, J. J. Nutrition and reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 25-34, 1996.
- 6 FERNÁNDEZ, M.; GIRÁLDEZ, F. J.; FRUTOS, P.; LAVÍN, P.; MANTECÓN, A. R. Effect of undegradable protein supply on testicular size, spermogram parameters and sexual behavior of mature Assaf rams. **Theriogenology**, v. 62, n. 1, p. 299-310, 2004.
- 7 HOTZEL, M. J.; MARKEY, C. M.; WALKDEN-BROWN, A. W.; BLACKBERRY, M. A.; MARTIN, G. B. Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino Rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 2, p. 217-230, 1998.
- 8 FERNÁNDEZ, M.; GIRÁLDEZ, F. J.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; MANTECÓN, A. R. Effect of undegradable protein concentration in the pos-weaning diet on body growth and reproductive development of Assaf rams. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2206-2218, 2005.
- 9 ABI SAAB, S.; SLEIMAN, F. T.; NASSAR, K. H.; CHEMALY, I.; EL-SKAFF, R. Implications of high and low protein levels on puberty and sexual maturity of growing male goat kids. **Small Ruminant Research**, v. 25, n. 1, p. 17-22, 1997.
- 10 EL-AZAB, A. I.; KHADR, N. A.; ZAHKAN, K. Effect of non-protein nitrogen in the ration on ram semen quality. **Small Ruminant Research**, v. 27, n. 1, p. 73-77, 1998.
- 11 THOMPSON, L. H.; GOODE, L.; HARVEY, R. M.; MYERS, R. M.; LINNERUD, A. C. Effects of dietary urea on reproduction in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 399-405, 1973.
- 12 DANA, N.; TEGEGNE, A.; SHENKORU, T. Feed intake, sperm output and seminal characteristics of Ethiopian highland sheep supplemented with different

- levels of leucaena (*Leucaena Leucocephala*) leaf hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3, p. 239-249, 2000.
- 13 AL-HABOBY, A. H.; SALMAN, A. D.; ABDUL KAREEM, T. A.; CHELBUS, E. Influence of protein supplementation on reproductive traits of Awassi sheep grazing cereal stubble. **Small Ruminant Research**, v. 34, n. 1, p. 33-40, 1999.
- 14 CORTADA, C. N. M. **Efeito de níveis crescentes de nitrogênio não protéico na dieta sobre níveis de uréia plasmático, parâmetros reprodutivos e citogenéticos de ovinos (*Ovis aries*, LINNAEUS 1758) deslanados**. 1998. 82 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 15 GONZALEZ, R. A. F. **Efeitos do nível de nitrogênio na dieta sobre características do sêmen de ovinos**. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 16 BRADEN, A. W. H.; TURNBULL, K. E.; MATTNER, P. E.; MOULE, G. R. Effect of protein and energy content of the diet on the rate of sperm production in rams. **Australian Journal Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 67-73, 1974.
- 17 CHURCH, D. C. **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Prentice Hall, 1988. 564 p.
- 18 FRON, M. J.; BOLING, J. A.; BUSH, L. P.; DAWSON, K. A. Sulfur and nitrogen metabolism in the bovine fed different forms of supplemental sulfur. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 2, p. 543-552, 1990.
- 19 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of domestic animals: nutrient requirements of sheep**. 6th. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1985. 99 p.
- 20 BARUSELLI, M. S. Minerais orgânicos: o que são, como funcionam e vantagens do seu uso em ruminantes. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA, 2., 2000, Botucatu. **Anais... Botucatu: FMVZ. UNESP, Botucatu**, 2000. p.19.
- 21 SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science Technology**, v. 58, n. 1, p. 151-163, 1996.
- 22 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of Analysis Association of Official Agricultural Chemists**. 11th ed. Washington: AOAC, 1980. 1051 p.
- 23 MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1978. v. 1.
- 24 KOVÁCS, A.; FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic e Histochemistry**, v. 67, n. 3, p. 119-124, 1992.
- 25 NAGY, S.; HÁZAS, G.; BALI PAPP, A.; IVÁNCICS, J.; SZÁSZ, J. F.; KÓVACKS, A.; FOOTE, R. H. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. **Theriogenology**, v. 52, n. 7, p. 1153-1159, 1999.
- 26 BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinæe Medicinæ**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.
- 27 PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. Piracicaba: Nobel, 1987. 467 p.
- 28 RUEDA, E.; COMBELLAS, J. Evaluacion de la suplementacion con bloques multinutricionales en un sistema de produccion ovina. II. Parámetros ruminales y niveles de urea en plasma. **Revista de la Facultad de Agronomia de la Universidad del Zulia**, v. 16, n. 1, p. 89-98, 1999.
- 29 LANGFORD, G. A.; SHRESTHA, J. N. B.; SANFORD, L. M.; MARCUS, G. J. Reproductive hormone levels of early postpubertal ram lambs in relation to breed, adult testis size and semen quality. **Small Ruminant Research**, v. 29, n. 2, p. 225-231, 1998.
- 30 MIES FILHO, A.; JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; WALD, V. B. Variação estacional da produção espermática e do perímetro escrotal de ovinos da raça Hampshire Down. **A Hora Veterinária**, v. 73, n. 13, p. 53-57, 1993.
- 31 CAMERON, A. W. N.; MURPHY, P. M.; OLDHAM, C. M. Nutrition of rams and output of spermatozoa. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**, v. 17, p. 162-165, 1988.
- 32 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
- 33 MORAES, J. C. F.; SILVA, J. F.; PIEGAS, M. S.; MARTINS, S. C. R. Considerações sobre o exame andrológico em carneiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, n. 1/2, p. 9-15, 1981.
- 34 PEREIRA, R. J. T. A.; TULI, R. K.; WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2000.
- 35 MALIK, R. K.; LOHAN, I. S.; DHANDA, O. P.; TULI, R. K. Test for the acrosomal reaction of goat spermatozoa treated with heparin. **Small Ruminant Research**, v. 26, n. 1/2, p. 163-166, 1997.
- 36 TAMULI, M. K.; WATSON, P. F. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. **Animal Reproduction Science**, v. 35, n. 1/4, p. 247-254, 1994.
- 37 SALHAB, S. A.; ZARKAWI, M.; WARDEH, M. F.; AL-MASRI, M. R.; KASSEM, R. Development of testicular dimensions and size, and their relationship to age, body weight and parental size in growing Awassi ram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 2, p. 187-191, 2001.
- 38 SARAN NETTO, A.; ZANETTI, M. A.; ANARUMA, R. J.; GUIDI, V.; BARUSELLI, M. S. Efeitos da suplementação mineral com enxofre através do uso de fontes inorgânica x orgânica sobre o desempenho e conversão alimentar de bovinos de corte confinados. In: REUNIÃO TÉCNICA DA TORTUGA, 2006, São Paulo. **Anais... São Paulo: Tortuga Companhia Zootécnica Agrária**, 2006. 1 CD-ROM.