

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MARIA MICHELE ARAÚJO DE SOUSA CAVALCANTE

**CRIOPRESERVAÇÃO E AVALIAÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN
DE TOUROS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ-DURO E NELORE NOS
PERÍODOS SECO E CHUVOSO**

TERESINA-PI

2021

MARIA MICHELE ARAÚJO DE SOUSA CAVALCANTE

**CRIOPRESERVAÇÃO E AVALIAÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN
DE TOUROS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ-DURO E NELORE NOS
PERÍODOS SECO E CHUVOSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Magela Cortes Carvalho

TERESINA-PI
2021

CRIOPRESERVAÇÃO E AVALIAÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN DE
TOUROS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ-DURO E NELORE NOS PERÍODOS SECO E
CHUVOSO

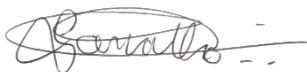
MARIA MICHELE ARAÚJO DE SOUSA CAVALCANTE

Aprovado em: 14/09/2021

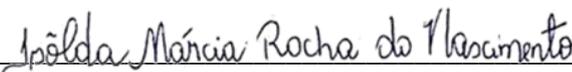
Banca Examinadora:



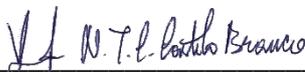
Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA
Universidade Federal do Piauí
(Presidente)



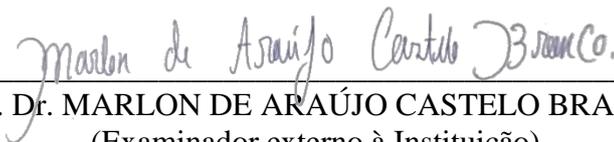
Dr. GERALDO MAGELA CORTES CARVALHO
EMBRAPA - PI
(Examinador externo à Instituição)



Prof. Dra. ISOLDA MARCIA ROCHA DO NASCIMENTO
Universidade Federal do Piauí
(Examinadora interna à Instituição)



Prof. Dra. YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO BRANCO
Universidade Federal do Maranhão
(Examinadora externa à Instituição)



Prof. Dr. MARLON DE ARAÚJO CASTELO BRANCO
(Examinador externo à Instituição)

Dedicatória

*A minha família, meus pais Francisco
Jocélio e Tânia Maria, aos meus irmãos
Felipe, Bruno e Fred e, aos meus
sobrinhos Mariah, Heitor e Romeo.*

Vocês são minha base.

Agradecimentos

Primeiramente, e acima de tudo, à DEUS, que esteve e está sempre ao meu lado. Que me ensina todos os dias que o **amor** é o único caminho para o sucesso e para felicidade. Sem Ele nada disso faria sentido.

Aos meus PAIS, TÂNIA MARIA ARAÚJO DE SOUSA CAVALCANTE e FRANCISCO JOCÉLIO LÚCIO CAVALCANTE que sempre acreditaram em mim, se hoje eu colho mais esse fruto é por que estava debaixo de duas árvores gigantes que sempre me proporcionaram sombra para crescer no amor e na fé de Deus.

À minha FAMÍLIA, em especial aos meus irmãos JOCÉLIO FELIPE, RIBAMAR BRUNO e JOELLIO FREDERICO, vocês são meu passado, meu presente e meu futuro, são extensões de um mesmo sonho. Agradeço as minhas cunhadas, LUCIANA FARIAS E MARLA LANDIM por serem pessoas maravilhosas e me dar a oportunidade de sentir, atualmente, o maior dos amores, o amor de tia, pelos meus sobrinhos MARIAH, HEITOR E ROMEO.

Ao meu orientador, Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA, homem ímpar, que aprendi a amar e a respeitar como pessoa e como profissional dedicado que é. Sua força me fez forte para seguir com o doutorado em meio a pandemia. Essa força é admirável e louvável, só tenho a agradecer por Deus ter cruzado nossos caminhos nessa vida. Com certeza levarei muitas coisas boas que aprendi com o senhor, por onde eu for.

Ao meu eterno orientado, Prof. Dr. AÍRTON MENDES CONDE JUNIOR, por me ensinar não somente as bases da pesquisa e da ciência, mas a ter paixão pelo ensino e pela pesquisa. Obrigada por me fazer enxergar longe e não esquecer de dar amor aos que estão por perto, por me dar os “puxões de orelha” que foram essenciais para dar realidade a tudo que enfrentei e que iria enfrentar mais na frente. Sou muito de você e sei que você é um pouco de mim. Pode contar comigo sempre e sei que a recíproca é verdadeira.

Ao meu coorientador, professor doutor GERALDO MAGELA CORTES CARVALHO, por todo apoio para a realização desse doutorado, por abrir as portas da EMBRAPA – PI. Pelas experiências e aprendizado durante as viagens.

Aos membros da banca, Dra. ISOLDA MARCIA ROCHA DO NASCIMENTO, Dra. YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO BRANCO e Dr. MARLON DE ARAÚJO CASTELO BRANCO, por todas as considerações pertinentes ao crescimento deste trabalho e principalmente para o meu crescimento.

Aos meus amigos e companheiros da equipe do LBRA: SERGIO HENRIQUE, MARCOS CELESTINO, MISAEL SANTANA, MARIA LUIZA, ANNA MONALLYSA, e LUANA EVANGELISTA pelos conselhos, pela amizade, e apoio.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, ANDREZZA BRAGA, ANSELMO LUSTOSA e RONIELLE PEREIRA pela amizade, ajuda e convivência durante a pós.

Às minhas amigas, CAROL CRONEMBERGER, CAMILA COELHO E LAIANA NOGUEIRA por tornarem meus dias mais leves, estando ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Federal do Piauí-UFPI, ao Centro de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, que tornaram possível essa longa jornada, desde a graduação até este sonhado curso de doutorado.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal – LBRA, que possibilitou a execução e conclusão do projeto de maneira satisfatória, por meio do uso de seus equipamentos e instalações.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo suporte de infraestrutura para a análise do CASA.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo para realização do Curso.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para esse sonho.

A todos, Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Bovino Curraleiro Pé-Duro	17
2.2 Bovino Nelore	18
2.3 Controle Neuroendócrino Reprodutivo do Macho	19
2.4 Avaliação Clínico-andrológica	20
2.4.1 <i>Análise de imagem</i>	22
2.5 Estresse térmico na Reprodução animal	24
2.6 Diluição, criopreservação e avaliação pós-descongelação do sêmen	26
2.6.1 <i>Sondas Fluorescentes</i>	28
2.6.2 Cinética Espermática por sistemas computadorizado	30
3. ESTRUTURAÇÃO DA TESE	32
CAPÍTULO I*	33
<i>Relação entre adaptabilidade e qualidade seminal de touros Curraleiro Pé-Duro e Nelore em clima tropical úmido</i>	34
CAPÍTULO II*	51
<i>Características do movimento espermático de sêmen de Curraleiro Pé-Duro e Nelore nos períodos seco e chuvoso na região Meio-Norte do Brasil</i>	52
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE TABELAS

Pág.

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Classificação andrológica por pontos para touros da Subespécie <i>Bos taurus taurus</i> , baseada na circunferência escrotal e nas características físicas e morfológicas do sêmen.....	21
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Parâmetros meteorológicos referentes aos dias das realizações das coletas seminais na região Meio-Norte do Brasil, referentes ao período chuvoso (fevereiro a abril) e período seco (agosto a outubro).....	40
Tabela 2. Dados biométricos das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco.....	41
Tabela 3. Dados seminais imediatos das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco	42
Tabela 4. Dados pós-descongelção das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período seco.....	43
Tabela 5. Concentração plasmática de cortisol das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco	44

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros meteorológicos referentes aos dias das realizações das coletas seminais na região Meio-Norte do Brasil, referentes ao período chuvoso (fevereiro a abril) e período seco (agosto a outubro).....	57
Tabela 2. Dados biométricos das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco.....	59
Tabela 3. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco	61
Tabela 4. Dados de onda de pulso do US Doppler das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco.	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES**Pág.**

Figura 1. Análise das ondas de pulso em US Doppler do funículo espermático de touros da raça CPD e Nelore, representado por padrões de onda63

LISTA DE GRÁFICOS**Pág.**

Gráfico 1. Gráfico tipo Box Plot referente aos parâmetros meteorológicos dos períodos seco e chuvoso nas datas das coletas seminais das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas	58
---	----

LISTA DE ABREVIACOES

CPD – Curraleiro Pé-Duro

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

mOsm – Miliosmol

mOsm/L – Miliosmol por litro

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

LH – Hormônio luteinizante

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

TTR – Reação de termoresistência

MT – Motilidade total

MP – Motilidade progressiva

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade linear progressiva

VAP – Velocidade média do trajeto

ALH – Amplitude de deslocamento lateral

BCF – Frequência de batimento flagelar

STR – Retilinearidade

LIN – Linearidade

WOB - Oscilação

DCF – Diacetato de carboxifluoresceína

IP – Iodeto de propídio

PNA – *Arachis hypogea*

PSA – *Pisum sativum*

ATP – Adenosina trifosfato

JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina

PE - Perímetro Escrotal

CTE - Comprimento do Testículo Esquerdo

CTD - Comprimento do Testículo Direito

LTE - Largura do Testículo Esquerdo

LTD - Largura do Testículo Direito

FE - Funículo espermático

BT - Bipartição testicular

PS - Pisco sistólico

ED - Diástole final

PI - Índice de pulsatilidade

RI - Índice de resistivo

RESUMO

O objetivo deste (objetivou-se com o presente trabalho avaliar estresse térmico) estudo foi analisar, comparativamente as respostas fisiológicas e seminiais ao estresse térmico na raça Curraleiro Pé-Duro (CPD), bovino tropicalmente adaptado, e na raça Nelore em diferentes períodos estacionais (seco e chuvoso) na região Meio-Norte brasileira. Para tanto, foram utilizados 12 touros previamente selecionados de acordo com as Normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, sendo seis da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus taurus*), e seis da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), sendo os CPD oriundos da Unidade de Pesquisa da EMBRAPA Meio-Norte localizada no município de Campo Maior – PI, enquanto os Nelore foram provenientes da Fazenda Vitória localizada no município de Brasileira – PI. Foram realizados exames comparativos entre as duas raças, iniciando pela análise clínica reprodutiva de cada animal, o qual consiste na examinação do sistema genital, contemplando a inspeção e/ou palpação dos órgãos que constitui o sistema genital masculino. Nesse contexto, cabe ressaltar a utilização da Ultrassonografia Doppler no contexto da avaliação. Foram realizadas, pelo método da eletroejaculação, seis coletas de cada animal, cujo material foi avaliado de imediato quanto aos parâmetros de volume, aspecto, motilidade total e vigor espermático. De imediato uma alíquota de cada amostra foi diluída em formol salino para determinação da concentração e dos defeitos espermáticos. Em seguida, com base na concentração estabelecida foi feita a diluição do sêmen, sendo então criopreservados em máquina automatizada (TK 3000) pelo método de congelamento lento, e estocado em botijões criogênicos. Trinta dias após a descongelamento, as amostras foram analisadas quanto a valores de termorresistência (TTR), cinética (CASA), integridade da membrana plasmática e acrossomal. Para análise dos dados foram utilizadas médias e desvio padrão, além do teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguem distribuição Normal. Para comparar as médias entre as raças e entre os períodos foi usado o teste t de Student e o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. Os dados foram tabulados e analisados no IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

Palavras-chave: Bovino, adaptabilidade, mudanças climáticas, avaliação andrológica.

ABSTRACT

The aim of this study was to comparatively analyze the physiological and seminal responses to heat stress in the Curraleiro Pé-Duro (CPD) breed, a tropically adapted bovine, and in the Nellore breed in different seasonal periods (dry and rainy) in the tropical Brazilian region. For this purpose, 12 bulls previously selected according to the Rules of the Brazilian College of Animal Reproduction were used, six of the Curraleiro Pé-Duro breed (*Bos taurus taurus*), and six of the Nellore breed (*Bos taurus indicus*), with the CPD coming from the Research Unit of EMBRAPA Meio-Norte located in the municipality of Campo Maior – PI, while the Nellore were come from Fazenda Vitória located in the municipality of Brasileira – PI. Comparative tests were performed between the two breeds, starting with the clinical reproductive analysis of each animal, which consists of examining the genital system, including inspection and/or palpation of the organs that constitute the male genital system. In this context, it is worth emphasizing the use of Doppler ultrasonography in the evaluation context. Six collections from each animal were carried out using the electroejaculation method, and the material was immediately evaluated in terms of volume, aspect, total motility and spermatic vigor. Immediately, an aliquot of each sample was diluted in saline formaldehyde to determine the concentration and sperm defects. Then, based on the established concentration, the semen was diluted, then cryopreserved in an automated machine (TK 3000) by the slow freezing method, and stored in cryogenic cylinders. Thirty days after thawing, the samples were analyzed for thermoresistance (TTR), kinetics (CASA), plasma and acrossomal membrane integrity. For data analysis, means and standard deviation were used, in addition to the Shapiro-Wilk test to verify if the data follow a Normal distribution. To compare the means between races and between seasons, the Student t test and the non-parametric Mann-Whitney U test were used. Data were tabulated and analyzed in the IBM Statistical Package for the Social Sciences version 20.0. The significance level adopted was $p \leq 0.05$.

Keywords: Bulls, adaptability, climate change, andrological assessment.

1. INTRODUÇÃO

É bem documentado que fatores ambientais podem afetar negativamente a produção animal, causando grandes perdas econômicas para o agricultor (CARDOSO et al, 2016), e como espécie referência dentro da movimentação econômica do país (IBGE, 2016), os bovinos são considerados homeotérmicos, pois tendem a manter a temperatura corporal constante através do fluxo de calor determinado por processos que dependem da temperatura e da umidade ambiental. Assim, o estresse térmico através da hipertermia ocorre quando o fluxo de calor para o ambiente é menor que o calor produzido pelo organismo (BEEDE; COLLIER, 1986). Quando os animais se encontram na zona de termoneutralidade os custos fisiológicos são mínimos e a produtividade é aumentada (AZEVEDO et al., 2008).

Fatores envolvidos na determinação do conforto térmico dos animais são definidos pelo ambiente como a temperatura do ar, temperatura radiante, radiação solar, umidade do ar e pressão atmosférica. Características corporais também são inclusas como a forma corporal, tamanho, área de superfície, área exposta à radiação solar, bem como a resposta dessas características corporais à ventilação, emissividade, absorvidade e refletividade são razões avaliativas para o conforto térmico (BIANCHIN et al., 2006)

O estresse provocado pelo calor excessivo diminui a ingestão de alimentos e ocasiona distúrbios no metabolismo de proteínas, energia, balanço mineral, reações enzimáticas e secreção de hormônios e metabólitos no sangue (CARDOSO et al, 2016). Assim alterações metabólicas dão início ao esgotamento das reservas de energia celular, levando a novas estratégias adaptativas no metabolismo homeotérmico (BAUMGARD; RHOADS, 2013).

Os mesmos danos podem ser notados em níveis reprodutivos, que de fato, Barth e Oko (1989) já haviam documentado que a temperatura testicular bovina elevada tem um efeito adverso na produção de espermatozoides e na qualidade do sêmen de touros reprodutores. Pois para a produção de espermatozoides viáveis e morfologicamente normais os testículos bovinos devem ser mantidos abaixo da temperatura corporal (KASTELIC; COOK; COULTER, 1997).

Assim, animais adaptados ou tolerante às condições locais nas regiões produtoras tem sido foco de pesquisas, para a avaliação da tolerância ao calor, avaliação de sêmen criopreservado em banco de germoplasma, adaptabilidade às condições climáticas do semi-árido (CARDOSO et al., 2016; MONTESINOS, 2012; AZEVÊDO et al., 2008), abrindo portas para aprofundar o conhecimento no âmbito reprodutivo. Esses animais são caracterizados pela capacidade de sobreviver em condições ambientais e climáticas extremas, pois mantêm ou mostram uma

redução mínima no desempenho produtivo exibindo alta eficiência reprodutiva, resistência a doença, longevidade e baixa taxa de mortalidade durante a exposição ao estresse (GEORGE et al., 2014).

Dentro dessa premissa, o gado Curraleiro Pé-Duro (CPD), introduzido no Brasil pelos colonizadores portugueses no início do século XVI, originou animais adaptados aos biomas onde serão submetidos, por consequência da deriva genética e a pressão de seleção natural exercida pelo ambiente (CARVALHO et al., 2013). Segundo Azevedo *et al.* (2008) os bovinos dessa raça são bem adaptados ao trópico quente e seco não mudando suas medidas fisiológicas no decorrer do dia e do ano, apesar das altas temperaturas do ambiente onde são criados.

No entanto, apesar de diversos estudiosos do assunto tenham proposto, desde muitos anos, medidas para conservar ou melhorar o gado CPD, infelizmente pouco foi feito e esta raça, principalmente relacionado à biotecnologia da reprodução, que segundo Carvalho e colaboradores (2001) é uma ação fundamental para auxiliar no alcance da conservação. Corroborando para essa premissa, a maioria das raças brasileiras tropicalmente adaptadas foi substituída por raças de origem zebu, principalmente Nelore, na tentativa de aumentar a produtividade de gado brasileiro (SANTOS et al., 2005).

Para tal, tecnologias reprodutivas, como a ultrassonografia em modo B vem cada vez mais sendo usada rotineiramente, pois é uma técnica segura e não invasiva para a identificação dos parâmetros biométricos testiculares que tem correlação direta com o potencial de fertilidade (EILTS; PECHMAN, 1988; PINHO, et al. 2018). A ultrassonografia Doppler tornou-se o método de escolha para avaliar o suprimento sanguíneo de vários órgãos. É uma das técnicas mais simples e precisas para estimar o fluxo sanguíneo, pois combina dados relativos à anatomia e aos parâmetros dinâmicos do fluxo (VELASCO; RUIZ, 2021).

É de grande interesse pecuário pesquisar bovinos que reúnam as melhores características da raça, com vista à produção de carne com qualidade em regiões quentes e inóspita. O objetivo deste estudo foi analisar, comparativamente as respostas fisiológicas, seminais e de imagem da raça bovina tropicalmente adaptadas (Curraleiro Pé-Duro) e exótica (Nelore), em diferentes períodos estacionais (seco e chuvoso).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bovino Curraleiro Pé-Duro

Atualmente, o Brasil possui várias espécies de animais domésticos, que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonos portugueses logo após a descoberta. Durante quase cinco séculos, estas raças serão naturalmente selecionadas em ambientes distintos, de tal forma que, hoje, apresentam características adaptadas às condições ambientais específicas. Essas raças desenvolvidas no Brasil são conhecidas como “crioulo”, “local” ou naturalizadas (MARIANTE; EGITO, 2002)

O gado Curraleiro Pé-Duro (CPD) teve sua origem na península Ibérica, sendo introduzidos pelos colonizadores portugueses no início do século XVI no Brasil. O CPD originou-se a partir do tronco étnico *Bos taurus ibericus*, e dada a sua origem européia, é presumido pertencer à subespécie *Bos taurus taurus* (CARVALHO et al., 2013). No Piauí a raça foi introduzida por volta de 1674, por Domingos Afonso Mafrense, a partir do rio São Francisco (NOGUEIRA NETO, 1980), descendendo dos mesmos bovinos introduzidos pelos portugueses no período colonial, resultando da adaptação destes às condições ambientais do Piauí e de outros estados brasileiros (CARVALHO, 1986).

Como critério para identificação desses animais, Domingos et al. (1956) elencou características de conformação que descrevessem a raça CPD. O animal precisa ter Cabeça pequena, perfil subcôncavo, orbitas não muito salientes. Chifres curtos e em forma de coroa, leves, apresentando seção circular; de cor clara na base e extremidade escura. Orelhas pequenas, revestidas internamente de pelos claros. Boca grande e ventas largas. Pescoço fino, barbela reduzida. Tronco de conformação triangular, característica das raças leiteiras. Peito profundo, ventre volumoso, ancas largas, garupa direita. Cauda fina, longa e bem inserida, sendo tolerável a inserção alta, vassoura preta, membros delgados e bem proporcionados.

A pelagem do CPD é singular, sendo amarela, amarela avermelhada ou baía com extremidades escuras até o fuscão, não muito carregado; os pelos das entre-nádegas e axilas devem ser de tonalidade clara ou esbranquiçada, bem como do baixo-ventre. Cabeça de tonalidade escura, acentuando-se no chanfro e em torno dos olhos; focinho preto com orla de pelos claros. Membros de cor escura, tonalidade mais pronunciada na região da canela, especialmente nos membros anteriores, onde pode elevar-se até acima dos joelhos; podendo ser mais escura, nos touros; unhas pretas (DOMINGOS et al., 1956).

Esse gado se formou no norte do Brasil, principalmente na região Nordeste e no Vale do São Francisco, onde posteriormente foi para os campos e cerrados de Minas Gerais e Goiás, incluindo atualmente o estado do Tocantins (CARVALHO; GIRÃO, 2001). E o resultado da seleção natural foi o motivo principal da sobrevivência dos animais adaptados a estas condições desfavoráveis do sertão brasileiro (CARVALHO; GIRÃO, 1999).

Na América Latina, as raças de gado locais serão a base pecuária por quase cinco séculos e hoje estão no ponto de serem totalmente absorvidas por raças exóticas. A expectativa de que as raças introduzidas solucionem os problemas de produção e aquelas relacionadas à saúde e nutrição das populações locais, levou-as a cruzá-las com as linhagens exóticas sem planejamento sistemático de melhoramento genético ou genético. Este modelo produtivo, que ainda persiste em muitas regiões, causou o declínio ou desaparecimento de diferentes raças (FIORAVANTE et al., 2011). Atualmente a conservação, manutenção e caracterização genética desta população é objeto de trabalho da Rede de Recursos Genéticos Animais (RGAs) da Plataforma de Recursos Genéticos da EMBRAPA e de seus parceiros (EGITO *et al.*, 2011).

2.2 Bovinos Nelore

A raça Nelore passou por intenso melhoramento genético no Brasil, sendo direcionada quase que exclusivamente à produção de carne, embora na sua origem a raça tenha sido utilizada para a exploração leiteira. O Nelore se adaptou muito bem às condições tropicais brasileiras, por possuir excelente capacidade de aproveitar alimentos grosseiros. Apresenta resistência natural a parasitas, devido às características de seus pelos, que impedem ou dificultam a penetração de pequenos insetos na superfície da pele ou que aí tentam se fixar. A pele escura, fina e resistente, dificulta a ação de insetos sugadores, além de produzir secreção oleosa repelente, que se intensifica quando os animais estão expostos ao calor (ACNB, 2006).

O Nelore é muito resistente ao calor devido à sua superfície corporal ser maior em relação ao corpo e por possuir maior número de glândulas sudoríparas. As características de seus pelos também facilitam o processo de troca com o ambiente. Além disso, o trato digestivo é 10% menor em relação aos europeus. Portanto seu metabolismo é mais baixo e gera menor quantidade de calor. Os machos e as fêmeas apresentam elevada longevidade reprodutiva (PEREIRA; ELER; FERRAZ, 2002).

Com o advento da pecuária de corte, foi fundamental selecionar animais visando melhorias nos desempenhos produtivo e reprodutivo, pois esses animais que determinam a eficiência total de produção, tanto do ponto de vista genético como econômico (BOLIGON;

ALBUQUERQUE; RORATO, 2008). A seleção com base em características de desempenho ponderal tem sido amplamente utilizada, para a formação de novas raças através de cruzamentos controlados e conseqüente aumento na exploração econômica, como foi o caso da raça Nelore (KOOTTS; GIBSON, 1996).

Em busca do conhecimento das estimativas de correlações genéticas entre características de desempenho ponderal e reprodutivo, o Nelore vem sendo amplamente explorado, não somente no âmbito econômica, como também dentro das pesquisas, no intuito de definir a junção das melhores características dentro de uma raça. Para isso, estudos envolvendo genética, herdabilidade, melhoria do sêmen pela análise escrotal (MAGALHÃES et al., 2019; SCHMIDT et al., 2019) vêm sendo amplamente empregado nessa raça.

2.3 Controle neuroendócrino reprodutivo do macho

A puberdade está definida no macho como a época em que atinge a capacidade para fertilizar uma fêmea. Isto significa que o indivíduo deve ter número suficiente de espermatozoides fecundantes, além de um comportamento sexual que permita a cópula (WINTER, 1990).

A puberdade é atingida aos 12 meses nos bovinos (*Bos tauros indicus* / *Bos taurus taurus*)^b, ou também pode ser considerado que no touro a puberdade é atingida quando o número de espermatozoides totais por ejaculado é de 50 milhões. No período pós-puberal, os testículos do touro continuam a crescer e o número de espermatozoides/ejaculado vai aumentando até a idade de 18-24 meses, quando a maturação é alcançada (MELLO, 2015).

Com o início da puberdade, ocorre um pronunciado aumento de testosterona, que está correlacionado com o padrão de secreção de LH, hormônio que estimula a secreção direta de testosterona nas células de Leydig. Os eventos primários que estabelecem o início da puberdade são originados no SNC e concorrem para causar uma alteração no padrão de secreção hipotalâmica de GnRH. Fatores hormonais e, possivelmente, um fator nervoso direto, influem no crescimento e na maturação testicular (DE KRETZER; KERR, 1988).

Com a puberdade, um padrão pulsátil de secreção de GnRH inicia, ocorrendo um pico de secreção de gonadotropinas durante o período pós-puberal. Também, têm sido achados receptores para GnRH no tecido intersticial do testículo, sugerindo uma função controladora deste hormônio hipotalâmico na secreção de andrógenos, possivelmente mediante inibição. Assim, a esteroidogênese testicular estaria influenciada por dois fatores: (a) o padrão de

secreção dos hormônios hipotálamo-hipofisiários, e (b) a resposta das células intersticiais a esses hormônios (GONZÁLEZ, 2002).

O controle mais importante da síntese de andrógenos no testículo é feito pelo LH, existindo uma regulação feedback negativa. O LH se une a seu receptor nas células de Leydig, sendo que cada célula tem cerca de 20.000 receptores. Experimentalmente foi observado que os receptores do LH também unem o hormônio hCG. O receptor para LH é uma glicoproteína de 180 kD, composta por 2 subunidades proteicas idênticas de 90 kD (DADOUNE; DEMOULIN, 1993).

A regulação hipotalâmica da secreção de andrógenos está determinada pela secreção de GnRH. Fatores externos, como a luz e ou estímulos olfatórios (feromônios) ou visuais, podem aumentar a secreção de GnRH via sistema nervoso central, mediante neuro-receptores que incluem a dopamina, a norepinefrina e a serotonina. A função secretora das células de Leydig é estimulada pela prolactina, favorecendo a síntese de receptores para LH (efeito oposto ao da fêmea) e possivelmente melhorando a atividade enzimática da síntese de testosterona a partir de colesterol. O FSH também parece favorecer a presença de receptores para LH nas células de Leydig (CHACUR, 2012).

O stress ocasiona aumento da secreção de ACTH, o qual inibe a secreção de LH no macho, e, portanto, de testosterona, desfavorecendo a espermatogênese e a libido. Os glicocorticóides secretados pela ação do ACTH também parecem ter ação inibitória direta sobre a secreção das gonadotropinas (ENCARNAÇÃO, 1986).

Entretanto, as mudanças na sensibilidade hipotalâmica, medida pelo número de receptores, não são tão evidentes fazendo perder relevância à hipótese gonadostática, por outro lado, é evidente que os animais imaturos são mais sensíveis que os animais pós-púberes ao efeito inibitório dos esteróides gonadais sobre a liberação de gonadotropinas (GONZÁLEZ, 2002).

2.4 Avaliação clínica andrológica

A utilização do exame andrológico nos sistemas de produção foi demonstrada por WILTBANK e PARISH (1986), através do aumento de 5% na fertilidade de rebanhos de vacas Santa Gertrudis acasaladas com touros selecionados pela qualidade do sêmen. O exame andrológico passou a ser utilizado então como instrumento para incremento da fertilidade e

produtividade dos sistemas de produção de bovinos de corte (MORAES; HORN; ROSADO JR, 1998).

O exame andrológico é uma das técnicas mais utilizadas pelos médicos veterinários para avaliar a fertilidade. É caracterizado por exame clínico, medida de circunferência escrotal e avaliação do sêmen para motilidade, vigor, turbilhonamento, concentração e morfologia (SALVADOR et al., 2002). A fertilidade dos touros é um ponto importante na produção animal, pois dependendo do sistema de acasalamento utilizado, um único reprodutor pode servir a um grande número de fêmeas (KASTELIC et al., 2000).

No Brasil, para avaliação, classificação e seleção de touros de raças zebuínas, várias tabelas têm sido propostas com algumas adaptações, principalmente relacionadas à idade e à circunferência escrotal (FONSECA et al., 1997a). Atualmente, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) preconiza duas tabelas de pontuação: uma instituída por Fonseca et al. (1997a) para touros zebuínos (*Bos taurus indicus*) e outra para touros europeus (*Bos taurus taurus*), segundo padrões preconizados por Chenoweth e Ball (1980).

A interpretação desta classificação é expressa em satisfatórios, 60 a 100 pontos; questionáveis, 30 a 59 pontos; e insatisfatórios, abaixo de 30 pontos, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação andrológica por pontos para touros da Subespécie *Bos taurus taurus*, baseada na circunferência escrotal e nas características físicas e morfológicas do sêmen.

Circunferência Escrotal em cm					
Idade/meses	12 – 14	15 – 20	21 – 30	> 30	Escore
Muito Bom	> 34	> 36	> 38	> 39	40
Bom	30 – 34	31 – 36	32- 38	34 – 39	24
Satisfatório	< 30	< 31	< 32	< 34	10
Pobre	< 30	< 31	< 32	< 34	10
Motilidade Espermática					
	%Progressivo	Vigor	Escore		
Muito Bom	75	5	20		
Bom	60 < 75	4 < 5	12		
Satisfatório	30 < 60	3 < 4	10		
Pobre	< 30	< 3	3		
Morfologia Espermática					

	%Def.maiores	%Def. totais	Escore
Muito Bom	< 10	< 25	40
Bom	10 < 19	26 < 39	25
Satisfatório	20 < 29	40 < 59	10
Pobre	> 29	> 59	3

Interpretação	
60 pontos ou +	Touro Satisfatório
30 a 59	Touro Questionável
< 30	Touro Insatisfatório

Fonte: Chenoweth e Ball (1980)

Segundo Derivaux (1980), a avaliação da motilidade espermática é definida com o percentual de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen e o vigor é a intensidade de seu movimento. A avaliação da motilidade espermática deve ser realizada imediatamente após a colheita ou descongelação do sêmen, com auxílio de microscopia óptica de luz (SEAGER; FLETCHER, 1972), em microscópio de contraste de fase ou em analisador computadorizado.

Deve-se avaliar o vigor espermático, que é a intensidade da motilidade exibida pelos espermatozoides móveis. Para isso, utilizam-se classificações que variam conforme o autor, com escalas que vão de 1 a 5 (PLATZ; SEAGER, 1977).

O tamanho dos testículos ou biometria testicular é estimado, medindo-se a circunferência ou perímetro escrotal (PE). O PE é medido com o touro em estação, posicionando o dedo polegar e o indicador na região superior (cabeça do epidídimo), tracionando levemente para baixo. Os testículos deverão ficar imóveis no escroto durante a aferição. A fita métrica deverá ser colocada na porção central do escroto, onde o diâmetro testicular é maior (FERNANDES; MORAES, 2010).

2.4.1 Análise de imagem

No campo da medicina veterinária e da produção animal, muitas técnicas têm surgido com o intuito de facilitar cada vez mais, os diferentes procedimentos do profissional da área das ciências agrárias, trazendo benefícios à clínica médica e aos setores da produção animal e também agregando mais valor científico às pesquisas (ROBERTO; SOUZA, 2014).

A ultrassonografia, em geral, seguiu os princípios delineados pelo desenvolvimento da acústica, sobretudo nos seus primórdios. Os benefícios do ultrassom como meio de diagnóstico

por imagem na medicina veterinária são inúmeros. Exames de rotina têm demonstrado que a ultrassonografia não apresenta efeitos biológicos nocivos; é um procedimento seguro para o paciente e para o operador. O método pode ser realizado em qualquer local sem a necessidade de segurança específica (PRESTON; SHAW, 2001). Trata-se de uma forma não invasiva e, por isso, bem tolerada pelos animais, que permite o diagnóstico de enfermidades, assim como o acompanhamento da evolução terapêutica (NYLAND; MATTON, 2002).

O som é uma onda mecânica e sua propagação se dá pela vibração das partículas do meio no qual se alastra. Ultrassom é um termo que se aplica à onda sonora cuja frequência é superior àquela percebida pelo ouvido humano, ou seja, acima de 20KHz (CARVALHO, 2004).

A velocidade da onda sonora e sua propagação é uma característica do meio, sendo uma constante, independente da frequência (ANDREUCCI et al., 2002). O equipamento de ultrassom pressupõe uma velocidade de som constante em tecidos moles, embora existam suaves diferenças. No entanto, quando um feixe encontra gás ou osso, ocorrem diferenças marcantes de velocidade nesses meios que resultam em forte reflexão e interpretação imprópria dos ecos.

Os sinais elétricos que são produzidos e processados pelos cristais do transdutor retornam como ecos ao mesmo e, posteriormente, ao monitor e são analisados de acordo com a sua força e amplitude. O cálculo da distância corrida pelo som, ou seja, entre o objeto de estudo e o transdutor, é feito com base no tempo que a onda demora em chegar ao objeto, refletir e retornar ao transdutor. Quanto maior o tempo que o som demorar a retornar ao transdutor, mais distantes estará o objeto. O eco retornado é transformado em impulso elétrico pelo cristal, enviado a um amplificador e demonstrado no monitor com intensidades proporcionais à sua energia. Dessa forma, eles podem ser decodificados de diferentes modos: modo-A, modo-B e modo-M (FARROW, 1992).

O desenvolvimento de novas tecnologias tem melhorado muito a qualidade das imagens produzidas por aparelhos de diagnóstico por imagem e o conhecimento sobre os princípios físicos, termos e artefatos de técnica, é fundamental para otimizar a avaliação ultrassonográfica (PEIXOTO, 2010).

O doppler colorido fornece uma ideia geral da presença e direção do fluxo sanguíneo. Ele codifica as mudanças de frequência em vermelho e azul. Se a frequência for positiva, a imagem ficará vermelha, enquanto se for negativa, será azul. Além da cor, o brilho da imagem é levado em consideração, pois quanto maior o brilho, maior a amplitude da frequência

(ABDELRAHMAN et al., 2018). Os testículos requerem um suprimento de sangue estável para sua função e maturação. O doppler colorido do fluxo sanguíneo em direção ao parênquima testicular podem refletir as mudanças funcionais que ocorrem nos diferentes períodos reprodutivos (STRINA et al., 2016).

O fluxo sanguíneo de um vaso individual é avaliado de forma semiquantitativa usando os índices Doppler. Esses índices têm sido usados para obter informações sobre o fluxo sanguíneo e a impedância vascular. Eles dependem das medidas do Volume Pico Sistólico (PSV), Volume Diastólico Final (EDV) e da velocidade média. Além disso, os dois índices amplamente utilizados são o Índice de Resistência (RI) e o Índice de Pulsatilidade (PI), eles não são uma medida direta do fluxo sanguíneo, mas sim descrever a resistência ao fluxo sanguíneo em vasos periféricos ao vaso que está sendo examinado (BOLLWEIN et al., 2016).

2.5 Estresse térmico na reprodução animal

As respostas fisiológicas normais para regular a temperatura do corpo podem ser oprimidas quando o animal é exposto ao calor, ambiente úmido, ou então não é capaz de adotar mecanismos comportamentais para minimizar a exposição ao calor, resultando em estresse por calor, como consequência pode ter por exemplo a diminuição do consumo de ração, diminuição do ganho de peso ou diminuição da produção de leite, logo após o início do estresse (MORRELL, 2020).

Todas as espécies animais podem ser afetadas pelo estresse térmico causado pelo calor e também pelo frio, mas na pecuária se destacam os estudos acerca de bovinos e ovinos (SILVA, 2000). Considerando que o estresse térmico é um fator que pode afetar as funções reprodutivas, as variações no clima encontradas no Brasil podem estar relacionadas com a queda na qualidade seminal de reprodutores observada em certos períodos do ano (GABALDI; WOLF, 2002; SOUZA; BATISTA, 2012; VIANNA et al., 2013).

A formação das células espermáticas pode ser afetada pelo aumento da temperatura testicular (GABALDI; WOLF, 2002). Considerando que o estresse térmico pode afetar a espermatogênese, visto que pode levar ao aparecimento de alterações no epitélio seminífero dos testículos, o clima tropical característico do Brasil pode estar relacionado com a queda na qualidade seminal de touros (GABALDI; WOLF, 2002).

A qualidade do sêmen congelado em ruminantes também pode ser influenciada pela época do ano, dependendo das particularidades climáticas de cada região, podendo ocorrer

principalmente elevação no percentual de espermatozoides anormais e variação na concentração espermática (CHACUR et al., 2012; FRENEAU, 2011; SILVA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2011). Avaliando reprodutores bovinos da raça Curraleiro Pé-duro, adaptada ao bioma Cerrado, verificou-se que o sêmen fresco manteve características adequadas durante todo o ano e que a qualidade do sêmen congelado é melhor entre os meses de junho a setembro (TEIXEIRA et al., 2011).

Em touros de origem taurina criados em regiões tropicais, geralmente o declínio na qualidade do sêmen é mais pronunciado quando há estresse calórico. Isso parece ocorrer não somente por possuírem um sistema de termorregulação menos adaptado ao calor, mas também pela maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana da célula espermática, o que predispõe a um estresse oxidativo mais intenso (RODRIGUES et al., 2015).

Estudando bovinos submetidos à insolação escrotal por um período de 48 horas, Rahman et al. (2011) observaram que o aumento da temperatura testicular afeta principalmente as células que estão nas fases da meiose e da espermiogênese. Em um estudo com touros taurinos, zebuínos e mestiços, a qualidade do sêmen nos taurinos e mestiços foi pior que nos zebuínos quando expostos a ambientes com altas temperaturas (BRITO et al., 2004).

A probabilidade de ocorrência de estresse térmico pelo calor é maior em ambientes quentes e com alta umidade, devido a redução da taxa de perda de calor evaporativa pela superfície corporal (TAKAHASHI et al., 2009). Em resposta a esses eventos, ocorre o aumento da temperatura corporal e a glândula tireoide, que é responsável pela termogênese, diminui a liberação dos hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), ocasionando um declínio da taxa metabólica e todo o eixo hipotálamohipófise-gônada é afetado. Essas mudanças metabólicas parecem estar intimamente ligadas aos efeitos negativos na reprodução durante o estresse térmico. Por fim, as adaptações fisiológicas ao ambiente térmico podem fazer com que a termorregulação testicular, além da liberação de hormônios necessários para a espermatogênese, seja prejudicada podendo resultar em uma espermatogênese imperfeita (QUEIROZ et al., 2015).

As trocas de calor por radiação entre os animais e o meio ambiente são bastante relevantes em se tratando de regiões de clima tropical. Para tentar minimizar ou evitar os problemas advindos do estresse térmico, existem estratégias que abrangem intervenções ambientais, na fisiologia animal e soluções para as técnicas de biotecnologia da reprodução. Há décadas, estudos vêm relatando a importância das modificações físicas no ambiente, como

mudanças nas instalações e sombreamento, além da seleção genética de indivíduos mais tolerantes ao calor para reduzir os efeitos adversos supracitados em diversas espécies (RENAUDEAU et al., 2012; ROTH, 2008).

Dentre as recomendações básicas estão: evitar o manejo dos animais nos períodos mais quentes do dia e realizar a adequação das instalações zootécnicas, quando necessário. Na criação extensiva, o sombreamento natural e/ou artificial é um dos métodos com melhor custo-benefício, sendo que o natural tem a vantagem da evaporação das folhas. Além disso, a cobertura vegetal proporciona um isolamento térmico ao solo, o que evita aquecimento excessivo pela radiação solar e influencia na reflexão dessa radiação sobre os animais. Métodos para aumentar as perdas de calor pelo animal, como promover a ventilação natural nas instalações e o resfriamento dos animais por meio de aspersão de água podem ser necessários, quando se tratar de animais não adaptados e de alta produção (RENAUDEAU et al., 2012). Estas práticas são, na maioria dos casos, onerosas e não economicamente e/ou tecnicamente viáveis em países tropicais em desenvolvimento. Por isso, o melhoramento genético para tolerância ao calor continua sendo a abordagem mais efetiva frente aos desafios climáticos, visto que é esperado que raças tropicalmente adaptadas ao ambiente ao qual evoluíram lidem melhor com os efeitos das mudanças climáticas que as raças exóticas especializadas (FAO, 2015; SILVA, 2000).

2.6 Diluição, criopreservação e avaliação pós-descongelamento do sêmen

Tradicionalmente, o diagnóstico de fertilidade de um macho é realizado pela avaliação descritiva da qualidade do sêmen, com ênfase no número de espermatozoides presentes no ejaculado, sua motilidade e morfologia. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esse conceito não possui efeito significativo na taxa de fertilidade. Com base nessa visão, tem sido desenvolvido um grande número de testes para avaliar vários aspectos da função espermática e prever a capacidade fertilizante do espermatozoide *in vivo* com certo grau de precisão. Dentre esses testes podem ser citados os que avaliam as características do movimento espermático, o potencial de membrana mitocondrial, a integridade de membrana plasmática e acrossomal, a capacitação e reação acrossomal, o reconhecimento da zona pelúcia, a fusão espermatozoide-ovócito, o grau de estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide e a integridade do seu DNA (MAIA, 2006).

Os procedimentos de congelamento/descongelamento do sêmen ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações

na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (BALL; VO, 2001). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico e à adição e remoção de crioprotetores (WATSON, 2000; BALL; VO, 2001).

Durante o processo de criopreservação o sêmen deve ser refrigerado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37°C a 20°C), sem ocasionar danos ao espermatozoide. Para isto é necessário diluir o sêmen em meio adequado. O estresse inicial se dá quando o espermatozoide é submetido à temperatura de refrigeração (5°C), devido à transição de fase da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002).

Quando efetuado de modo inadequado, o processo de refrigeração do sêmen causa choque térmico que induz a ocorrência de danos espermáticos irreversíveis, como padrão anormal de movimento (movimento circular ou retrógrado), perda rápida da motilidade, lesões no acrossoma e na membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

O desafio celular durante a congelação e descongelação não é a capacidade da célula suportar temperatura muito baixa, mas de atravessar uma das fases críticas do processo, que é a redução da temperatura de -15 a -60°C. As células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo extracelular que determina a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com consequente desidratação celular (HOLT, 2000). A formação de cristais de gelo ocorre no espaço extracelular, criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução extracelular congelada que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de refrigeração, a água se move através da membrana plasmática e se une à fase congelada do meio extracelular ou irá congelar, formando gelo no interior da célula. Na maioria dos casos, as células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lesionadas devido à perda da integridade da membrana (DENVIREDDY et al., 2002).

Durante o processo de criopreservação, a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelação do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de cristais de gelo. Quando estes cristais começam a se formar, ocorre aumento da temperatura, necessária à cristalização, o que pode ser deletério para o espermatozoide. O efeito da cristalização sobre os espermatozoides é minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelação. Quando o processo de congelação é muito lento ocorre a congelação da água

extracelular com a consequente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico e determinando perda rápida da água, ocasionando desidratação celular e aumento da concentração de soluto extracelular. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda de água, promovendo, com isso, a formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1985).

Sob a temperatura de 5°C, a água intra e extracelular permanece super-refrigerada e não cristaliza. No entanto, entre as temperaturas de -5 e -10°C tem início à formação de cristais de gelo no meio extracelular, o qual permanece super-refrigerado, ocorrendo troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular. Neste momento, a curva de congelação deve ser lenta, para evitar a congelação da água intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. A desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, determinando colapso da membrana. A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar grandes canais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (MEDEIROS et al., 2002).

2.6.1 Sondas fluorescentes

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

A tecnologia de coloração tem, de certa forma, possibilitado a avaliação da capacidade funcional de espermatozoides em várias espécies (HARRISON e VICKERS, 1990; COLETO et al., 2002; AZEVEDO, 2006; MAIA et al., 2009; BATISTA et al., 2009; SILVA et al., 2009a). Várias sondas fluorescentes têm sido usadas e validadas para análise da integridade das membranas em espermatozoides de caprinos, como: diacetato de carboxifluoresceína (DCF) em combinação com iodeto de propídio (IP) (COLETO et al., 2002); corante ácido nucléico permanente (SYBR®14) em combinação com IP (PETERSON et al., 2007) e Hoechst 33258 (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006).

O DCF possui baixo peso molecular, o que possibilita sua passagem através da membrana plasmática celular. Esta substância é hidrolisada por esterases, resultando em

carboxifluoresceína livre, a qual permanece retida no interior da célula quando a membrana plasmática está intacta, fluorescendo em verde. O IP é um análogo do brometo de etídio, o qual passa através da membrana celular danificada e se liga ao DNA e RNA, produzindo fluorescência vermelha no núcleo de células mortas. O IP é excluído de células intactas e mostra-se muito efetivo na identificação de células não viáveis (JONES; SENEFT, 1985).

Coletto et al. (2002), utilizando o DCF em combinação com o IP para avaliação da viabilidade de espermatozoides descongelados de reprodutores caprinos da raça Pardo Alpina, determinaram pequena correlação entre a técnica de fluorescência e a motilidade e o vigor espermáticos ($r = 0,1403$), e concluíram que tais corantes são eficientes para avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides desta espécie.

Peterson et al. (2007), usando uma combinação de sondas fluorescentes (SYBR®14/IP), estudaram a integridade das membranas de espermatozoides caprinos da raça Saanen e concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18 e 4 °C ($r = 0,77$ e $0,98$, respectivamente). Além disso, evidenciaram pequena correlação entre a porcentagem de espermatozoides vivos e a taxa média de partos ($r = 0,44$ a 18 °C; $r = 0,27$ a 4 °C).

As lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos, têm sido marcadas com fluorescência para mapear a estrutura da superfície dos espermatozoides de mamíferos, sendo usadas para distinguir células com acrossomo reagido daquelas com acrossomo intacto. As lectinas mais utilizadas são as aglutininas derivadas do *Arachis hypogea* (PNA) e *Pisum sativum* (PSA) (VALCÁRCEL et al., 1997). Estas lectinas fluorescentes se ligam à membrana acrossomal externa (PNA) ou ao conteúdo acrossomal (PSA). O uso do PNA tem mostrado similaridade com o PSA em análise da integridade acrossomal de espermatozoide caprino submetidos à refrigeração ou congelamento (ABOAGLA; TERADA, 2004).

A mitocôndria tem sido objeto de estudos, sendo esta organela essencial para a fisiologia espermática e responsável pela produção de energia a partir da produção de ATP (adenosina trifosfato), possibilitando o movimento celular. Alterações no potencial de membrana mitocondrial podem interferir nas características espermáticas e na fertilidade masculina (CÂMARA; GUERRA, 2008). Deste modo, a integridade funcional das mitocôndrias é importante para a sobrevivência espermática no trato genital da fêmea (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2009).

A capacidade de monitorar alterações no potencial de membrana mitocondrial das células pode ser crucial para elucidar mudanças da fisiologia celular em várias situações experimentais. Os reagentes mais comuns que são sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso do uso dessas sondas em células vivas deve-se ao fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS et al., 1991). A sonda mitocondrial JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazólio carbocianina) existe como um monômero com excitação e emissão no comprimento de onda verde (510-520 nm). Entretanto, ele também exibe um segundo pico na faixa do vermelho-laranja (590 nm). O fenômeno que produz a fluorescência vermelha-laranja deve-se à formação de J-agregados. O JC-1 consegue identificar populações mitocondriais com diferentes potenciais de membrana. Mitocôndrias com alto potencial fluorescem em vermelho-laranja devido à formação de J-agregados (quando a concentração de JC-1 na mitocôndria aumenta, este corante forma agregados que fluorescem laranja), enquanto que aquelas mitocôndrias com baixo a médio potencial de membrana florescem em verde, devido ao fato do JC-1 no estado de monomérico fluorescem em verde (GARNER et al., 1997; GRAHAM, 2001; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2009).

2.6.2 Cinética Espermática por Sistema Computadorizado

Usualmente, a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise é impreciso, mesmo quando executado por técnicos experientes. Esta imprevisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implantação de padrões para a avaliação (ARRUDA et al., 2007).

Na tentativa de diminuir esta imprevisão, grande atenção tem sido dada aos métodos objetivos de análise da motilidade espermática, entre eles a análise computadorizada (Computer Assisted Sêmen Analyses – CASA). Programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermática das características seminais (ARRUDA et al., 2003).

De acordo com Verstegen et al. (2002), além da motilidade total (MT) e da motilidade progressiva (MP) outros parâmetros são reportados pelo CASA com relação a velocidade do espermatozoide: velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL -

$\mu\text{m/s}$) e velocidade média do trajeto (VAP - $\mu\text{m/s}$). Cada um descreve um aspecto diferente da trajetória do espermatozoide. A VCL é a distância percorrida pelo espermatozoide ao longo do caminho curvilíneo percorrido. A VSL é a distância em linha reta entre o primeiro e o último ponto da trajetória percorrida do espermatozoide. A VAP é a velocidade média da trajetória do espermatozoide. A amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide em sua trajetória (ALH - μm) está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, tendo efeito sobre a fertilização. A frequência de batimento flagelar (BCF - Hz) é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. A retilinearidade (STR - %) é a relação porcentual entre a VSL e a VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta. Uma trajetória com baixa amplitude teria uma elevada STR. A linearidade (LIN - %) é a relação porcentual entre a VSL e a VCL. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade. Uma trajetória circular teria uma baixa LIN.

Alguns valores dos parâmetros observados pelo sistema CASA têm sido correlacionados com eventos fisiológicos. O padrão de cinética do espermatozoide caracterizado por uma motilidade altamente progressiva associada a um significativo movimento lateral de cabeça tem sido correlacionado com a habilidade de penetrar no muco cervical (AITKEN et al., 1985). Desta forma, Verstegen et al. (2002) relataram que VCL e VAP podem prever os resultados nos processos de fertilização, em virtude de ambos se encontrarem aumentados após a capacitação espermática.

3. ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Este estudo encontra-se estruturado da seguinte forma: Resumo, Introdução, Revisão de Literatura, seguido de dois capítulos, Considerações Finais e Referências Bibliográficas, de acordo com a Resolução 001/03-CCMCA de 22.05.2003, que estabelece as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. O capítulo I contém o artigo “RELAÇÃO ENTRE ADAPTABILIDADE E QUALIDADE SEMINAL DE TOUROS CURRALEIRO PÉ-DURO E NELORE EM CLIMA TROPICAL ÚMIDO” que foi submetido à revista ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE de classificação B1 para área ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS. O capítulo II contém o artigo “CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO DE SÊMEN DE CURRALEIRO PÉ-DURO E NELORE NOS PERÍODOS SECO E CHUVOSO NA REGIÃO MEIO-NORTE DO BRASIL” que foi submetido à revista ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA de classificação B2 para área ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS.

CAPÍTULO I*

*Apresentado segundo normas do periódico ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

1 **Relação entre adaptabilidade e qualidade seminal de touros Curraleiro Pé-Duro e** 2 **Nelore em clima tropical úmido**

3 4 **Resumo**

5 O objetivo desse estudo foi investigar e comparar os efeitos do período seco e
6 chuvoso na região Meio-Norte do Brasil, tanto na qualidade do sêmen fresco como na
7 viabilidade pós-descongelamento de ejaculado de touros Curraleiro Pé-Duro (CPD) e
8 Nelore. Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram realizados
9 segundo o Conselho Ético de Uso Animal aprovado com o registro nº 598/19. Foram
10 utilizados 12 touros, sendo seis da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus taurus*), e seis da
11 raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Sendo os CPD oriundos do Campo Experimental da
12 EMBRAPA localizado no município de Campo Maior – PI, enquanto os Nelore foram
13 provenientes da Fazenda Vitória localizada no município de Brasileira – PI. Foi realizada
14 a inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, foram tomadas as medidas biométricas
15 escroto-testicular. Foi realizada a coleta de sangue e análise das concentrações
16 plasmáticas de testosterona e cortisol foram determinadas pela técnica de
17 Enzimaimunoensaio. Foi realizada a coleta e análise imediata do sêmen, contemplando
18 as variáveis volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade total e do vigor espermático.
19 Com posterior criopreservação. Foram então realizadas as análises pós-criopreservação:
20 avaliação da morfologia, teste de termorresistência (rápido ou lento), integridade da
21 membrana plasmática e potencial da membrana mitocondrial. Para análise dos dados
22 foram utilizadas médias e desvio padrão, além do teste Shapiro-Wilk para verificar se os
23 dados seguem distribuição Normal. Para comparar as médias entre as raças e entre os
24 períodos foi usado o teste t de Student e o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. Os
25 dados foram tabulados e analisados no IBM Statistical Package for the Social Sciences
26 versão 20.0. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Observou-se que as mudanças
27 climáticas (Temperatura, umidade e chuva acumulada) foram nitidamente significativas
28 para os parâmetros explorados ($P < 0,05$), quando comparado dentro da mesma raça em
29 diferentes períodos sazonais o volume do ejaculado teve uma queda significativa ($P <$
30 $0,05$) do período mais ameno para o período com temperaturas mais altas, tanto para o
31 CPD como para o Nelore. Pode-se observar um aumento significativo ($P < 0,05$) da
32 motilidade e vigor dos animais CPD no período seco, não sendo observado esse aumento
33 no Nelore. O CPD teve uma queda significativa de defeitos menores e totais ($P < 0,05$)
34 no período seco. Para ambas as raças houve um aumento significativo ($P < 0,05$) de
35 testosterona no período seco e uma queda ($P < 0,05$) no cortisol para a raça CPD no
36 período seco. Os resultados reforçam o impacto do clima na qualidade do sêmen, embora
37 alguns parâmetros analisados tenham sido semelhantes nos diferentes períodos. Há então
38 a necessidade de mais pesquisas para melhor compreender a influência do clima na
39 reprodução de touros tropicalmente adaptados.

40
41 **Palavras-chave:** Touros, parâmetros seminais, região Meio-Norte, adaptabilidade.
42

44 **Introdução**

45 Desde a introdução dos primeiros bovinos no país, na época do descobrimento,
46 passaram-se séculos em que animais de raças da península ibérica foram se
47 desenvolvendo exclusivamente por seleção natural em determinados momentos e
48 ambientes ao ponto de desenvolver características específicas de adaptação às condições
49 aqui encontradas (MARIANTE et al., 2009). As raças aqui formadas passaram a ser
50 conhecidas como “nativas” ou “tropicalmente adaptadas”, dentre as quais podemos
51 destacar: Caracu, Mocho Nacional, Curraleiro Pé-duro, Pantaneiro e Crioulo Lageano
52 (EGITO et al., 2014).

53 No início do século 19, iniciou-se uma movimentação internacional de recursos
54 genéticos animais, viabilizada por novos conceitos acerca de melhoramento genético e
55 pela invenção do navio a vapor, o que propiciou o envio de reprodutores de alto valor
56 genético para outras partes do mundo. Mas foi somente em 1962 que vieram reprodutores
57 Nelore pertencentes às linhagens que mais influenciaram geneticamente o rebanho
58 brasileiro (FAO, 2010a; OLIVEIRA et al., 2002). Inicialmente, os resultados da heterose
59 obtidos pelos acasalamentos de animais das raças exóticas 3 com os das raças
60 tropicalmente adaptadas foram positivos para a pecuária, porém, a realização
61 indiscriminada destes cruzamentos levou várias raças ao risco de extinção enquanto
62 outras já se perderam (EGITO et al., 2002; FAO, 2010a; MARIANTE; CAVALCANTE,
63 2006; TEIXEIRA et al., 2011).

64 Bovinos do genótipo *Bos indicus* são conhecidos por serem mais termotolerantes
65 em resposta ao estresse térmico do que raças de origem europeia, o que foi
66 exaustivamente revisado por Hansen (2004). O gado Curraleiro Pé-Duro é uma raça
67 bovina de grande resistência, bem adaptada a ambientes desfavoráveis como as chapadas
68 semi-áridas do Nordeste brasileiro. Constitui um patrimônio genético de grande valor
69 científico e econômico. Um produto secular da adaptação a condições extremamente
70 severas. Sua notável rusticidade e capacidade de utilizar pastagens naturais em regiões
71 adversas, onde outras raças bovinas teriam poucas possibilidades de prosperar, são
72 qualidades que justificam sua conservação e estudo (CARVALHO et al., 2013).

73 É sabido que os animais podem sofrer estresse térmico quando a temperatura é
74 maior ou menor que a zona de conforto, e que eles necessitam dessa zona, normalmente
75 adquirida a noite, para manter a produção sob estresse térmico (NIENABER; HAHN,

76 2007). O mesmo raciocínio é aplicado em âmbito reprodutivo, no qual uma
77 espermatogênese fisiologicamente normal depende da manutenção testicular
78 (KASTELIC; COOK; COULTER, 1997).

79 Para garantir a longevidade dos gametas têm sido utilizados procedimentos que
80 visam reduzir ou interromper temporariamente o metabolismo através da refrigeração ou
81 congelamento (WATSON, 2000), sendo que a criopreservação seminal oferece muitas
82 vantagens à indústria da produção animal, principalmente quando associadas com
83 avaliação genética e programas de seleção. Entretanto, em muitas espécies, o maior
84 obstáculo antes mesmo de chegar as biotécnicas aplicadas é o conhecimento básico sobre
85 a fisiologia do animal associado ao ambiente em que ele vive (SALAMON; MAXWELL,
86 2000).

87 Poucas informações estão disponíveis sobre raças tropicalmente adaptadas,
88 especialmente informações sobre características fisiológicas e sazonalidade reprodutiva,
89 especialmente quando comparadas com raças comerciais. Fatores genéticos e ambientais
90 podem afetar a espermatogênese e a qualidade da ejaculação de touros (NICHI et al.,
91 2006). Assim, a exploração do material fecundante, com sucessivas pesquisas sobre a
92 morfologia espermática em associação a análise de imagem poderão permitir a exploração
93 econômica das raças tropicalmente adaptadas.

94 O objetivo desse estudo foi investigar e comparar os efeitos da mudança climática,
95 na região Meio-Norte do Brasil, tanto na qualidade do sêmen fresco como na viabilidade
96 pós-descongelamento de ejaculado de touros Curraleiro Pé-Duro e Nelore.

97 **Material e Métodos**

98 *Comitê de Ética*

99 Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram realizados segundo
100 o Conselho Ético de Uso Animal – CEUA, já submetidos ao Comitê de Ética e
101 Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEAA-UFPI) e aprovado com
102 o registro nº 598/19.

103 *Animais e Dados meteorológicos*

104 Foram utilizados 12 touros, sendo seis da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus*
105 *taurus*), e seis da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre 24 e 36 meses, com
106 escore corporal, 3,5 em uma escala variando de 1 (extremamente magro) a 5 (muito

107 obeso). Sendo os CPD oriundos do Campo Experimental da EMBRAPA localizado no
108 município de Campo Maior – PI, com coordenadas de Latitude 4° 55' 1,7" Sul,
109 e Longitude 42° 3' 33,4" Oeste, enquanto os Nelore foram provenientes da Fazenda
110 Vitória localizada no município de Brasileira – PI, com coordenadas de Latitude 4° 07'
111 51" Sul e Longitude 41° 46' 55" Oeste. O clima na região é classificado como tropical
112 subúmido (INMET, 2021), com temperaturas entre o máximo de 35°C e o mínimo de
113 23°C nos meses secos, e com o conjunto de dados meteorológicos dos últimos cinco anos
114 na região foram definidos os períodos mais amenos e mais quentes, respectivamente de
115 fevereiro a abril e de agosto a outubro. Além desses parâmetros ambientais registrados,
116 foram mensurados ao longo do experimento, a precipitação pluviométrica e a umidade
117 relativa do ar. Foram formados quatro grupos experimentais, contemplando as duas raças
118 e os dois períodos do ano (chuvoso e seco). Os animais foram mantidos sob o mesmo
119 sistema de manejo, recebendo suplementação mineral e água a vontade. Todos os animais
120 selecionados para a pesquisa foram escolhidos de acordo com os parâmetros
121 estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), valorizando
122 a inspeção e palpação dos órgãos que compõem o sistema genital dos reprodutores.

123 *Biometria escroto-testicular*

124 Previamente a realização das coletas de sêmen, além da inspeção e palpação dos
125 órgãos reprodutivos, foram tomadas as medidas biométricas escroto-testicular. As
126 medições da circunferência escrotal foram realizadas com auxílio de fita métrica
127 andrológica, posicionada na região mediana do escroto, no ponto de maior dimensão,
128 envolvendo as duas gônadas e a pele escrotal, enquanto que a largura e o comprimento
129 foram obtidos com o auxílio de um paquímetro. A biometria testicular incluiu então o
130 comprimento testicular (CT) e largura (LT) e circunferência escrotal (CE).

131 *Perfil sérico (hormonal ou de testosterona e cortisol)*

132 Amostras de sangue de 20 ml (menor quantidade) foram coletadas duas vezes por
133 mês por punção da veia caudal. O sangue foi centrifugado imediatamente e o plasma foi
134 armazenado a - 20 ° C até análise hormonal. As concentrações plasmáticas de testosterona
135 e cortisol foram determinadas pela técnica de Enzimaimunoensaio, com a utilização de
136 kits Testosterona Total (USA 8505) e Cortisol (USA 9417).

137

138 *Coleta e avaliação imediata do sêmen*

139 Foram coletados seis ejaculados por touro, totalizando 36 ejaculados por raça, com
140 intervalo mínimo de sete dias entre os ejaculados, utilizando um eletroejaculador
141 automático (Biocon ® Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Brasil). Os ejaculados
142 foram coletados em tubos coletores graduados, acoplados a funis plásticos previamente
143 aquecidos em estufa mantida a 37°C. O sêmen coletado foi imediatamente avaliado
144 conforme metodologia proposta por Fonseca et al. (1992), contemplando as variáveis
145 volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade total e do vigor espermático. O
146 turbilhonamento (movimento em massa) foi avaliado com auxílio de um microscópio
147 binocular, em aumento de 100x. Para isso, uma gota de sêmen foi colocada sobre uma
148 lâmina previamente aquecida a 37°C e classificada de acordo com o movimento
149 espermático, em escala de 0 a 5. Posteriormente, utilizando nova alíquota de sêmen entre
150 lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, sob aumento de 400x, foram
151 classificados a motilidade (percentual de espermatozoides com movimento progressivo
152 retilíneo) e o vigor espermático (intensidade do movimento dos espermatozoides),
153 avaliado em escala de 0 a 5. Para avaliação das características morfológicas dos
154 espermatozoides, uma alíquota de sêmen de cada ejaculado foi acondicionada em
155 endendorff contendo 1,0 ml de solução formol salina tamponada (HÁNCOCK, 1957). Uma
156 alíquota do ejaculado, diluída em formol salino (diluição de 1:200) foi utilizado para
157 avaliação da concentração e morfologia espermática. A concentração foi realizada por
158 meio da técnica Câmara de Neubauer e o resultado expresso em número de
159 espermatozoides por mm³. A análise da morfológica espermática foi realizada por meio
160 da técnica de “Câmara úmida” e os defeitos classificados em maiores e menores de acordo
161 com a Blom (1971). Após a avaliação, cada ejaculado foi diluído com AndroMed®
162 (REF.: 13503/0200), para posterior criopreservação.

163 *Criopreservação*

164 Para a congelação do sêmen, o ejaculado foi diluído em um diluidor comercial
165 AndroMed® (REF.: 13503/0200) para dar uma concentração de $20 \times$
166 10^6 espermatozoides viáveis / palheta de 0,25 ml. A congelação foi realizada em máquina
167 TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), ajustada para uma
168 taxa de resfriamento de $-0,5 \text{ } ^\circ \text{C} / \text{min}$ da temperatura ambiente ($25 \text{ } ^\circ \text{C}$) até que a
169 temperatura de $5 \text{ } ^\circ \text{C}$ ser atingida. Após estabilização a $5 \text{ } ^\circ \text{C}$ por uma hora, o

170 congelamento foi realizado a -20°C / min até atingir uma temperatura de -120°C ,
171 quando as palhetas foram colocadas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C), e
172 armazenadas até o tempo de análise pós-criopreservação.

173 *Avaliação pós-descongelação*

174 A descongelação foi realizada em Banho-Maria a 37°C por 30 segundos, para
175 avaliação quanto à motilidade total e vigor no teste de termo resistência (TTR) e
176 integridade da membrana plasmática, conforme descrito a diante.

177 O teste de termorresistência foi realizado de acordo Viana et al. (2009), o qual
178 consiste em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota
179 de $5\mu\text{l}$ (10 microlitros) de sêmen descongelado foi incubada a 37°C em banho-maria, e
180 avaliada quanto à motilidade total e o vigor espermático por meio de microscopia de
181 contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora
182 acoplada, aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

183 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de
184 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis,
185 MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado
186 por Coletto et al. (2002), em que alíquotas de $10\mu\text{L}$ de sêmen (50microlitros) pós
187 descongelado foram diluídas em $150\mu\text{L}$ de Tris, $5\mu\text{L}$ de DCF e $20\mu\text{L}$ de IP e incubadas
188 por 10 min a 37°C . Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de
189 epifluorescência (400x; Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de
190 emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm.

191 Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi realizada pela utilização
192 de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE; WELCH, 2006). Alíquotas de
193 $50\mu\text{L}$ de sêmen pós-descongelado foram diluídas em $150\mu\text{L}$ de Tris contendo $5\mu\text{L}$
194 (entendimento – deixar mais claro) de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10
195 minutos a 38°C . Então, 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de
196 epifluorescência com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, utilizando o filtro de
197 emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides corados em
198 laranja foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial e aqueles
199 corados em verde foram classificados com baixo potencial de membrana.

200

201 *Análise estatística*

202 Para análise dos dados foram utilizadas médias e desvio padrão, além do teste
 203 Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguem distribuição Normal. Para comparar as
 204 médias entre as raças e entre os períodos foi usado o teste t de Student e o teste não-
 205 paramétrico U de Mann-Whitney. Os dados foram tabulados e analisados no IBM
 206 Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0. O nível de significância adotado
 207 foi $p \leq 0,05$. Para apresentação dos resultados utilizou-se tabelas e gráficos.

208 **Resultado**

209 Foi analisada a temperatura, umidade e chuva acumulada nos períodos das coletas
 210 e análises andrológicas realizadas nos animais (Tabela 1). Constatou-se que as mudanças
 211 climáticas foram nitidamente significativas para os parâmetros explorados. Pode-se notar
 212 também que a amplitude de variação de temperatura máxima e mínima dentro do período
 213 seco é maior quando comparada ao período chuvoso e que não houve um dia se quer de
 214 precipitação nas datas estabelecidas para a coleta de dados no período seco, corroborando
 215 com a devida classificação.

216 **Tabela 1.** Parâmetros meteorológicos referentes aos dias das realizações das coletas seminais na
 217 região Meio-Norte do Brasil, referentes ao período chuvoso (fevereiro a abril) e período seco
 218 (agosto a outubro).

	Tempo		p-valor
	Chuvoso (n=5)	Seco (n=6)	
	Média ± DP	Média ± DP	
Temperatura Máx.(°C)	33,40 ± 1,14	39,00 ± 1,41	<0,001^a
Temperatura Min.(°C)	25,04 ± 0,57	23,10 ± 2,10	0,055 ^b
Temperatura Med.(°C)	27,78 ± 0,67	30,50 ± 1,31	0,002^a
Umidade Med. (%)	84,22 ± 1,95	55,12 ± 5,89	0,006^b
Chuva acumulada 24h (mm)	26,96 ± 54,63	0,00 ± 0,00	0,011^b

219 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. P-valor com letras sobrescritas diferentes representa
 220 o teste utilizado ^at de Student; ^bU de Mann-Whitney. Valores significativos estão em negrito.

221 Ao analisar os dados biométricos (Tabela 2) das raças bovinas tropicalmente
 222 adaptadas (CPD) e exótica (Nelore), pode-se observar que não houve mudanças
 223 significativas ($P > 0,05$) entre os períodos seco e chuvoso, já que se tratava dos mesmos
 224 animais analisados. No entanto quando foi feita a comparação entre as raças os resultados
 225 deram significativamente diferentes ($P < 0,05$) na consistência, comprimento e largura do
 226 testículo, assim como no perímetro escrotal. (inteirar as características raciais)

227 **Tabela 2.** Dados biométricos das raças bovinas tropicalmente adaptada e exótica no período
 228 chuvoso e seco.
 229

Dados biométricos	Tempo		p-valor
	Chuvoso	Seco	
	Média ± DP	Média ± DP	
Consistência Testículo Esquerdo			
CPD	3,83 ± 0,39	3,83 ± 0,38	1,000
Nelore	4,83 ± 0,39	4,83 ± 0,38	1,000
p-valor	<0,001	<0,001	
Consistência Testículo Direito			
CPD	3,83 ± 0,39	3,83 ± 0,38	1,000
Nelore	4,83 ± 0,39	4,83 ± 0,38	1,000
p-valor	<0,001	<0,001	
Consistência do Epidídimo Esquerdo			
CPD	2,83 ± 0,39	2,83 ± 0,38	1,000
Nelore	2,83 ± 0,39	2,83 ± 0,38	1,000
p-valor	1,000	1,000	
Consistência do Epidídimo Direito			
CPD	2,83 ± 0,39	2,83 ± 0,38	1,000
Nelore	2,83 ± 0,39	2,83 ± 0,38	1,000
p-valor	1,000	1,000	
Perímetro Escrotal (PE)			
CPD	29,83 ± 2,12	29,83 ± 2,06	1,000
Nelore	33,33 ± 1,15	33,33 ± 1,12	1,000
p-valor	0,001	<0,001	
Comprimento do Testículo Esquerdo (CTE)			
CPD	9,18 ± 0,59	9,18 ± 0,61	0,730
Nelore	10,08 ± 0,36	10,08 ± 0,35	1,000
p-valor	0,001	<0,001	
Comprimento do Testículo Direito (CTD)			
CPD	9,18 ± 0,42	9,18 ± 0,41	0,921
Nelore	10,08 ± 0,54	10,08 ± 0,52	1,000
p-valor	0,002	<0,001	
Largura do Testículo Esquerdo (LTE)			
CPD	5,82 ± 0,78	5,81 ± 0,79	0,655
Nelore	6,55 ± 0,36	6,55 ± 0,35	1,000
p-valor	0,003	<0,001	
Largura do Testículo Direito (LTD)			
CPD	5,88 ± 0,56	5,86 ± 0,56	0,807
Nelore	6,50 ± 0,52	6,50 ± 0,51	1,000
p-valor	0,005	<0,001	
Funículo espermático (FE)			
CPD	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,000
Nelore	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,000
p-valor	1,000	1,000	
Bipartição testicular (BT)			
CPD	0,33 ± 0,49	0,33 ± 0,48	1,000
Nelore	0,17 ± 0,39	0,17 ± 0,38	1,000
p-valor	0,356	0,105	

230 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Valores de média em negrito na mesma coluna ou
 231 linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste de U de Mann-Whitney.

232 Ao analisar os dados seminais imediatos (Tabela 3), notou-se que quando
 233 comparado dentro da mesma raça em diferentes períodos sazonais o volume do ejaculado
 234 teve uma queda significativa ($P < 0,05$) do período mais ameno para o período com
 235 temperaturas mais altas, tanto para o CPD como para o Nelore. Porém isso não prediz
 236 uma queda na qualidade espermática, pelo contrário, pode-se observar um aumento
 237 significativo ($P < 0,05$) da motilidade e vigor dos animais CPD no período seco, não
 238 sendo observado esse aumento no Nelore. É interessante notar também que os defeitos
 239 espermáticos menores e totais foram significativamente menores ($P < 0,05$) no CPD no
 240 período seco e, mesmo o p-valor não se apresentando significativo, obtiveram-se valores
 241 expressivos na queda dos defeitos maiores. Já o Nelore, mesmo numericamente
 242 apresentando uma diminuição nos defeitos espermáticos de um modo geral, não foi
 243 significativa a queda do período chuvoso para o seco.

244 Quando comparamos os dados seminais imediatos (Tabela 3) entre as raças
 245 constatou-se que o Nelore se sobressaiu ($P < 0,05$) no parâmetro vigor dentro do período
 246 chuvoso, sendo que no período seco para a mesma medida as médias foram muito
 247 semelhantes.

248 **Tabela 3.** Dados seminais imediatos das raças bovinas tropicalmente adaptada e exótica no
 249 período chuvoso e seco.

	Tempo		p-valor
	Chuvoso	Seco	
	Média ± DP	Média ± DP	
Volume			
CPD	7,50 ± 3,21	3,21 ± 1,29	<0,001 ^b
Nelore	6,25 ± 1,69	4,04 ± 1,25	0,001 ^a
p-valor	0,245 ^a	0,122 ^a	
Turbilhonamento			
CPD	2,08 ± 1,08	2,67 ± 1,78	0,342 ^a
Nelore	2,33 ± 0,89	2,08 ± 1,73	0,660 ^a
p-valor	0,588 ^b	0,426 ^b	
Motilidade			
CPD	74,58 ± 11,96	83,75 ± 7,72	0,004 ^b
Nelore	82,92 ± 10,76	84,17 ± 7,93	0,901 ^b
p-valor	0,064 ^b	0,822 ^b	
Vigor			
CPD	3,00 ± 0,60	3,75 ± 0,62	0,004 ^b
Nelore	3,67 ± 0,49	3,92 ± 0,51	0,244 ^b
p-valor	0,010 ^b	0,625 ^b	
FS Diluição			
CPD	200,00 ± 0,00	200,00 ± 0,00	1,000 ^b

Nelore	200,00 ± 0,00	200,00 ± 0,00	1,000 ^b
p-valor	1,000 ^b	1,000 ^b	
Concentração			
CPD	134,58 ± 73,33	172,75 ± 96,94	0,288 ^a
Nelore	96,50 ± 80,37	114,42 ± 88,00	0,436 ^b
p-valor	0,238 ^a	0,122 ^a	
Defeitos maiores			
CPD	1,56 ± 1,24	1,19 ± 1,00	0,550 ^b
Nelore	2,73 ± 2,73	1,19 ± 1,00	0,138 ^b
p-valor	0,334 ^b	1,000 ^b	
Defeitos menores			
CPD	6,36 ± 3,04	3,33 ± 2,68	0,024^b
Nelore	5,88 ± 7,17	3,33 ± 2,68	0,451 ^b
p-valor	0,114 ^b	1,000 ^b	
Defeitos totais			
CPD	7,64 ± 3,65	4,13 ± 2,88	0,020^a
Nelore	8,38 ± 7,21	4,13 ± 2,88	0,093 ^b
p-valor	0,558 ^b	1,000 ^b	

250 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. P-valor com letras sobrescritas diferentes representa
 251 o teste utilizado ^at de Student; ^bU de Mann-Whitney. Valores significativos estão em negrito nas colunas e
 252 linhas.

253 Nos dados pós-descongelamento (Tabela 4) das raças bovinas tropicalmente
 254 adaptadas e exóticas no período seco não houve diferença significativa dentro do teste
 255 TTR, assim como para a avaliação de integridade de membrana e mitocôndria. Porém
 256 verificou-se que mesmo não apresentando o p-valor menor que 5%, a mitocôndria e a
 257 membrana das células espermáticas no CPD em média tiveram maior lesão quando
 258 comparadas à raça Nelore, mesmo assim em média a motilidade e o vigor espermático no
 259 CPD na 1^a hora do TTR permaneceu melhor comparativamente ao zebuino.

260 **Tabela 4.** Dados pós-descongelamento das raças bovinas tropicalmente adaptada e exótica no
 261 período seco.

Variáveis	Média ± DP
Motilidade	
CPD	33,89 ± 24,23
Nelore	29,72 ± 21,86
p-valor	0,620
Vigor	
CPD	2,17 ± 0,86
Nelore	2,00 ± 1,03
p-valor	0,641
TTR Motilidade 1h	
CPD	24,44 ± 24,61
Nelore	15,28 ± 14,60
p-valor	0,305
TTR Vigor 1h	
CPD	1,72 ± 1,02
Nelore	1,39 ± 0,92

p-valor	0,256
TTR Motilidade 2h	
CPD	10,56 ± 16,17
Nelore	7,78 ± 11,40
p-valor	0,842
TTR Vigor 2h	
CPD	0,72 ± 0,89
Nelore	0,78 ± 0,65
p-valor	0,557
TTR Motilidade 3h	
CPD	1,94 ± 5,18
Nelore	0,83 ± 2,57
p-valor	0,599
TTR Vigor 3h	
CPD	0,22 ± 0,55
Nelore	0,17 ± 0,38
p-valor	0,942
Membrana	
CPD	29,83 ± 12,84
Nelore	24,28 ± 10,54
p-valor	0,165
Mitocondria	
CPD	18,78 ± 7,95
Nelore	17,28 ± 10,34
p-valor	0,274

262 Os valores são expressos como média ± desvio padrão.

263 **Tabela 5.** Concentração plasmática de testosterona e cortisol das raças bovinas tropicalmente
264 adaptada e exótica no período chuvoso e seco.

Concentração	Tempo		p-valor
	Chuvoso Média ± DP	Seco Média ± DP	
Testosterona			
CPD	3,33 ± 3,90	5,99 ± 3,20	0,036^a
Nelore	3,86 ± 2,26	5,89 ± 1,79	0,006^b
p-valor	0,688 ^a	0,898 ^a	
Cortisol			
CPD	8,36 ± 5,54	6,31 ± 5,39	0,011^b
Nelore	5,59 ± 6,62	3,22 ± 3,29	0,604 ^b
p-valor	0,450 ^a	0,054 ^b	

265 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. P-valor com letras sobrescritas diferentes representa
266 o teste utilizado ^at de Student; ^bU de Mann-Whitney. Valores significativos estão em negrito nas colunas e
267 linhas.

268 Foi mensurado o nível sérico de cortisol e testosterona nas raças CPD e Nelore no
269 período chuvoso e seco (Tabela 5). Assim, pode-se notar que houve uma queda
270 significativa ($P < 0,05$) desse hormônio (cortisol) dentro da raça CPD no período seco.
271 Mesmo havendo uma queda dentro das médias da época chuvosa para a seca na raça
272 Nelore, a mesma não foi significativa ($P > 0,05$). Quando comparamos a concentração

273 plasmática de cortisol entre as raças verificou-se o CPD tem uma média maior que o
274 Nelore. Para ambas as raças houve um aumento significativo ($P < 0,05$) de testosterona
275 no período seco, com valores médios próximos. Não houve diferença significativa ($P >$
276 $0,05$) quando comparado a concentração de testosterona entre as raças nos devidos
277 períodos de coleta de dados.

278

279 **Discussão**

280 Observou-se que fatores ambientais podem influenciar diretamente nas variáveis
281 seminais (BRITO, et al. 2002). De acordo com os resultados obtidos nesse estudo os
282 dados biométricos (Tabela 2) não mudaram com a alteração climática, assim como outros
283 estudos mostraram que a biometria testicular de touro não muda com a estação do ano no
284 Brasil (BARBOSA et al., 1991; CALDAS et al., 1999; PINHO et al., 2001; e UNANIAN
285 et al., 2000), um estudo realizado por Teixeira e colaboradores (2011) diferiu dos demais
286 ao mostrar que a biometria testicular variou significativamente no gado CPD durante os
287 diferentes meses do ano. Porém quando houve comparação entre as raças taurinas e
288 zebuínas os resultados foram significativos, isso se deve pelo fato do distinto porte entre
289 as raças estudadas, favorecendo de um modo geral um maior tamanho corpóreo da raça
290 Nelore em detrimento do CPD.

291 Variações sazonais ligadas a características do sêmen de touros foram descritas
292 em estudos anteriores, como é o caso do trabalho de Koivisto e colaboradores (2009), que
293 avaliaram as características seminais como motilidade, vigor e morfologia espermática
294 em touros europeus e indianos presentes no sudoeste do Brasil sob a influência do clima
295 tropical, assim, observaram uma tolerância maior ao calor dos touros zebu comparado aos
296 taurinos, diferindo dos resultados deste trabalho, porém é importante ressaltar que as raças
297 taurinas selecionadas no citado estudo (Limousine e Simmental) tem uma menor
298 termotolerância ao estresse térmico. Em contrapartida há estudos que mostram a melhora
299 da motilidade e do vigor no sêmen de touros europeus durante o verão, assim como a
300 menor contagem de espermatozoides com defeitos (MENEGASSI et al, 2016),
301 corroborando com o resultado da Tabela 3, isso mostra a adaptação desses animais ao
302 ambiente em que o experimento foi realizado.

303 Ao analisar os dados seminais imediatos correlacionando as raças, o Nelore
304 apresentou maior vigor durante o período chuvoso quando comparado ao CPD, diferindo

305 do descrito por Rahka (1971) e Igboeli e colaboradores (1991), que encontraram melhores
306 resultados no verão. Essas variações de qualidade seminal podem ser influenciadas por
307 fatores como por exemplo a idade do animal (FUERST-WALTL et al., 2006; BALIC et
308 al., 2012; VINCE et al., 2018) e o estado nutricional (MONTESINOS et al, 2014),
309 variáveis essas controladas no nosso estudo. Já as mudanças no peso e na origem do
310 sêmen (fresco ou congelado) não interagem significativamente com os resultados
311 segundo Teixeira e colaboradores (2011), existindo ainda a possibilidade de o estresse ao
312 calor não afetar o esperma epididimal durante a espermatogênese (MEYERHOEFFER et
313 al., 1985).

314 Enquanto a qualidade do sêmen fresco foi afetada pela época do ano, o mesmo
315 não pode ser dito para o sêmen congelado / descongelado. Após a descongelação, houve
316 redução não significativa da qualidade do sêmen refletida por parâmetros de morfologia,
317 da integridade da membrana e mitocôndria, dos espermatozoides da raça CPD comparada
318 a Nelore. Sabe-se que a fertilidade é aumentada quando há um maior número de
319 espermatozoides com a membrana e mitocôndria intactas (CORREA et al., 1997;
320 TARTAGLIONE; RITTA, 2004; FERNANDES et al., 2008). Porém, a média da
321 motilidade e do vigor espermático no CPD na primeira hora do TTR permaneceu melhor
322 comparativamente ao zebuíno, sugerindo um menor consumo das substâncias nutritivas
323 do sêmen (BARROS et al., 2013).

324 A produção de testosterona pode ser um indicador da fertilidade em touros jovens,
325 por estar relacionada com a idade à puberdade (BRITO et al., 2007). A secreção de
326 andrógenos nos animais, aparentemente não é afetada pela exposição dos testículos ao
327 calor (SETCHELL, 2006), porém no período seco houve um aumento nos níveis de
328 testosterona em ambas as raças, o que supostamente pode ser uma adaptação dos animais
329 nascidos e criados em regiões quentes, visto por Gabaldi (2010) quando submeteu Nelores
330 à insolação escrotal havendo uma queda no nível de testosterona com posterior aumento
331 após período de adaptação. Os níveis de testosterona encontrados na literatura consultada
332 variam dentro da mesma raça e da faixa etária dos machos bovinos, podendo estar
333 relacionado às diferentes composições nutricionais, precocidade das linhagens, momento
334 das colheitas de sangue e do ganho de peso corpóreo (MANGAI CHACUR et al., 2010).

335 Entre as raças não é notada diferença significativas nas concentrações hormonais,
336 como já tinha sido relatado por Chase Jr. e colaboradores (1995) ao mensurar esses

337 hormônios nas raças Angus, Brahma e Hereford. No entanto houve uma diminuição nos
338 níveis de cortisol na raça CPD no período seco quando comparado ao período chuvoso.
339 Já foi demonstrado que o estresse térmico tem efeito sobre os níveis de cortisol
340 (AAKVAAG et al., 1978; LARSSON et al., 1983) mostrando também que o estresse
341 prolongado leva ao aumento dos níveis de cortisol e, ao mesmo tempo, à diminuição
342 níveis de testosterona. Em relação ao cortisol, observou-se uma tendência geral de
343 diminuição desse hormônio, isso está de acordo com Lamothe-Zavaleta (1990) e Sidibé
344 (1992), que constataram que os níveis de cortisol são elevados na estação chuvosa e
345 baixos na estação seca. Outra explicação é que os animais se acostumaram mais com o
346 manejo e com a coleta de sangue propriamente dita.

347 **Conclusão**

348 O Curraleiro Pé Duro foi pouco afetado pela época do ano deste estudo, pode-se
349 concluir a época do ano teve pouco efeito na biometria testicular e na qualidade do sêmen
350 fresco de touros CPD na região Meio-Norte do Brasil, o que mostra a adaptação deste
351 grupo genético às condições ambientais desta região.

352 O CPD se mostra mais adaptado reprodutivamente ao período de estiagem quando
353 comparado ao Nelore, visto que mantém ou até mesmo melhoram os parâmetros seminais
354 no período de temperaturas mais altas, corroborando com a definição de tropicalmente
355 adaptados.

356 **Referências**

357 BALIĆ, I. Majić et al. Effect of age and environmental factors on semen quality,
358 glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental
359 bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 423-431, 2012.

360 BARBOSA, R. T. et al. Biometria testicular e aspectos do sêmen de touros da raça
361 Canchim e Nelore. **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado**
362 **(ALICE)**, 1991.

363 BARROS, M. H. C.; SHIOMI, H. H.; AMORIM, L. S.; SIQUEIRA, J. B.; PINHO, R.
364 O.; LIMA, D. M. A.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; GUIMARÃES, J. D.
365 Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste
366 de termorresistência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p. 164-170, 2013.

367

- 368 BRITO, L. F. C. et al. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm
369 production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal**
370 **reproduction science**, v. 70, n. 3-4, p. 181-190, 2002.
- 371 BRITO, Leonardo FC et al. Effect of improved nutrition during calthood on serum
372 metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular
373 development in bulls. **Domestic animal endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 460-469, 2007.
374
- 375 CALDAS, M. E., PINHO, T. G., PINTO, P. A., NOGUEIRA, L. A. G., Testicular
376 biometry and morfology of young nelore bulls (*Bos taurus indicus*). **Braz. J. Anim.**
377 **Reprod.** v. 23, p. 210–212, 1999.
- 378 CARVALHO, G. M. C. et al. Avaliações fenotípicas da raça bovina Curraleiro Pé-duro
379 do semiárido do Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 9-20, 2013.
- 380 CHASE JR, C. C. et al. Plasma cortisol and white blood cell responses in different breeds
381 of bulls: a comparison of two methods of castration. **Journal of animal science**, v. 73, n.
382 4, p. 975-980, 1995.
- 383 EGITO, A. A. do et al. **Estrutura populacional e diversidade genética de raças**
384 **bovinas brasileiras localmente adaptadas**. 2014.
- 385 EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. D. S. M. Programa Brasileiro
386 de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Arch. Zootec.**, v. 51, p. 39–52, 2002.
- 387 FAO. **Situação mundial dos recursos genéticos animais para a agricultura e**
388 **alimentação - versão resumida**. Brasília: 2010a.
- 389 FUERST-WALTL, Birgit et al. Effects of age and environmental factors on semen
390 production and semen quality of Austrian Simmental bulls. **Animal reproduction**
391 **science**, v. 95, n. 1-2, p. 27-37, 2006.
- 392 GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e**
393 **cortisol em touros da raça Nelore, submetidos a insulação escrotal**. 2000. Dissertação
394 (Mestrado em Medicina Veterinária). Departamento de Reprodução Animal e Radiologia
395 Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000
- 396 HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress.
397 **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82–83, p. 349–360, 2004.

- 398 IGBOELI, G.; RAKHA, A. M. Seasonal changes in the ejaculate characteristics of
399 Angoni (short horn zebu) bulls. **Journal of animal science**, v. 33, n. 3, p. 651-654, 1971.
- 400 KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal/testicular thermoregulation
401 and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Veterinary Clinics of**
402 **North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 271-282, 1997.
- 403
- 404 MARIANTE, A. da S. et al. Present status of the conservation of livestock genetic
405 resources in Brazil. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 204-212, 2009.
- 406 MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças**
407 **domésticas da história do Brasil**. 2.ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e
408 Biotecnologia, 2006.
- 409 MEYERHOEFFER, D. C. et al. Reproductive criteria of beef bulls during and after
410 exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p.
411 352-357, 1985.
- 412 MUNGAI CHACUR, Marcelo George et al. Influência de um nutracêutico no sêmen,
413 testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos taurus*
414 *indicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 439-449, 2010.
- 415 NICHI, M. et al. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro
416 fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C.
417 **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334–340, 2007.
- 418 NIENABER, J. A.; HAHN, G. L. Livestock production system management responses to
419 thermal challenges. **Int. J. Biometeorol**, v. 52, p. 149–157, 2007.
- 420
- 421 OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M. S. M. **Nelore: base**
422 **genética e evolução seletiva no Brasil**, Embrapa Cerrados, 2002. Disponível em:
423 <www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/566499/doc49.pdf>
- 424 PINHO, T. G., NOGUEIRA, L. A. G., PINTO, P., ZAMBORLINI, L., GILARDI, S.,
425 CALDAS, M., SOUZA, R. M. Semen characteristics of young nelore bulls (*Bos taurus*
426 *indicus*) according to testicular biometry and morphology. **Braz. J. Anim. Reprod.** v. 25,
427 p. 187–189, 2001.

- 428 SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal reproduction**
429 **science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.
- 430 SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. **Animal Reproduction**,
431 Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 81-91, 2006.
- 432 SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A.; PORTO, J. A.; ABREU, U. G. P.; Estacionalidade
433 na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh x Nelore e Chianina
434 x Nelore. **Pesp Agrop Bras.** v. 26, p. 1751–1760, 1991.
- 435 TEIXEIRA, H. C. A. et al. Seasonal influence on semen traits and freezability from
436 locally adapted Curraleiro bulls. **Animal reproduction science**, v. 125, n. 1-4, p. 56-61,
437 2011.
- 438 UNANIAN, Maria Marina et al. Testicular biometrics characteristics to evaluate the
439 Nellore Zebu breed bulls. **R. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 1, p. 136-144, 2000.
- 440 VINCE, S. et al. Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and
441 spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm
442 periods of the year. **Animal**, v. 12, n. 3, p. 559-568, 2018.
- 443 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. **Animal**
444 **Reproduction Science**, v. 61, p. 481- 492, 2000.
445

CAPÍTULO II*

*Apresentado segundo normas do periódico ARQUIVO BRASILEIRO DE
MECIDINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

1 Características do movimento espermático de sêmen de Curraleiro Pé-Duro e 2 Nelore nos períodos seco e chuvoso na região Meio-Norte do Brasil

3 Resumo

4 O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade espermática em touros CPD e Nelore
5 em diferentes períodos climáticos com o auxílio da análise dos parâmetros de onda de
6 pulso do ultrassom doppler juntamente com a análise cinética espermática. Os
7 procedimentos seguiram o Conselho Ético de Uso Animal, aprovado pelo registro nº
8 598/19. Foram utilizados 12 touros, sendo seis da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus*
9 *taurus*), e seis da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre 24 e 36 meses. Sendo
10 os CPD oriundos do Campo Experimental da EMBRAPA localizada no município de
11 Campo Maior – PI, enquanto os Nelore foram provenientes da Fazenda Vitória localizada
12 no município de Brasileira – PI. Previamente foi realizada a inspeção e palpação dos
13 órgãos reprodutivos, foram tomadas as medidas biométricas escroto-testicular. Antes da
14 realização da coleta seminal os animais foram submetidos à avaliação testicular através
15 do US Doppler, a velocidade sistólica de pico (PS, cm/s), a velocidade diastólica final
16 (ED; cm/s) e o índice resistivo (RI) e o índice de pulsatilidade (PI) foram calculados. Foi
17 realizada a coleta e análise imediata do sêmen, com posterior congelação e análise da
18 cinética espermática através do CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*. Para análise
19 dos dados foram utilizadas médias e desvio padrão, além do teste Shapiro-Wilk para
20 verificar se os dados seguem distribuição Normal. Para comparar as médias entre as raças
21 e entre os períodos foi usado o teste t de Student e o teste não-paramétrico U de Mann-
22 Whitney. Os dados foram tabulados e analisados no IBM Statistical Package for the
23 Social Sciences versão 20.0. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Observou-se
24 que as mudanças climáticas foram nitidamente significativas para os parâmetros
25 explorados ($P < 0,05$), quando comparado dentro da mesma raça em diferentes períodos
26 sazonais o volume do ejaculado teve uma queda significativa ($P < 0,05$) do período mais
27 ameno para o período com temperaturas mais altas, tanto para o CPD como para o Nelore.
28 Pode-se observar um aumento significativo ($P < 0,05$) da motilidade e vigor dos animais
29 CPD no período seco, não sendo observado esse aumento no Nelore. O CPD teve uma
30 queda significativa de defeitos menores e totais ($P < 0,05$) no período seco. Os parâmetros
31 VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VAP ($\mu\text{m/s}$) e STR (%) foram significativamente maiores para
32 o CPD comparado a raça Nelore, enquanto que os parâmetros WOB (%) e BCF (Hz)
33 favoreceram o Nelore no período seco e chuvoso respectivamente. Nos parâmetros da
34 onda de pulso do US Doppler (OS, ED, RI e PI) todos os valores analisados não tiveram
35 uma diferença significativa com a alteração climática ($P > 0,05$). São necessários mais
36 estudos relacionados à onda de pulso do US relacionada a reprodução animal, porém os
37 valores cinéticos espermáticos dos touros CPD corroboram diretamente com a
38 prerrogativa de que a raça se adapta melhor às mudanças climáticas impostas pelo período
39 seco e chuvoso na região tropical úmida brasileira.

40
41 **Palavras-chave:** Touros, cinética espermática, onda de pulso, parâmetros seminais.

42
43

44

45 **Introdução**

46 A fertilidade do touro pode ser adversamente afetada por condições quentes e
47 úmidas, o atual aumento na temperatura global é uma preocupação para a produção futura
48 de gado (GWAZDAUSKAS, 1985). O estresse causado pelo calor ocorre quando os
49 mecanismos fisiológicos normais do corpo para regular a temperatura corporal não
50 conseguem lidar com as condições externas. Os testículos e o escroto têm seus próprios
51 mecanismos reguladores complexos para proteger os espermatozoides em
52 desenvolvimento durante seus estágios mais vulneráveis, mas mesmo estes podem ser
53 oprimidos por condições externas desfavoráveis (BRITO et al, 2004; AYODEJI;
54 SUWAIBA, 2013).

55 O corrente aumento da temperatura global resulta em mudanças climáticas que
56 implicam profundamente na futura produção do gado, mesmo nos países que têm clima
57 temperado (ROJAS-DOWNING et al., 2017). As respostas fisiológicas normais para
58 regular a temperatura corporal podem ser sobrecarregadas quando o animal é exposto a
59 um ambiente quente e úmido, ou não pode adotar mecanismos comportamentais para
60 minimizar a exposição ao calor, resultando em estresse por calor. Este último se manifesta
61 por diminuição do consumo de ração, diminuição do ganho de peso ou diminuição da
62 produção de leite, logo após o início do estresse (MORELL, 2020).

63 A regulação da temperatura escrotal ocorre da mesma forma que no resto do
64 corpo. Em touros, a pele escrotal é fina, desprovida de gordura subcutânea e relativamente
65 sem pelos. É mais densamente suprido com glândulas sudoríparas do que a pele de outras
66 partes do corpo do touro para auxiliar na transferência de calor, permitindo que o calor
67 seja removido através do suor (BLAZQUEZ; MALLARD; WEDD, 1988). O estresse
68 térmico pode ter um efeito significativo na fertilidade (KASTELIC, 2013); a temperatura
69 ambiente ideal para a produção de esperma foi relatada como sendo 15-18 °C para todo o
70 período de espermatogênese, ou seja, por 65-70 dias antes da coleta (PARKINSON,
71 1987).

72 A reprodução é um dos fatores econômicos mais importantes na pecuária, com
73 base não apenas na capacidade reprodutiva da fêmea, mas também do macho (SAMIR et
74 al., 2018). A avaliação dos parâmetros reprodutivos do macho é um componente
75 importante e uma prática comum em espécies agrícolas domésticas. Destina-se a prever
76 a capacidade reprodutiva dos machos e nos permite identificar e retirar machos inférteis

77 do programa de criação, selecionando os indivíduos com melhor desempenho como
78 reprodutores (SIGLA et al., 2017; TIBARY et al., 2000). Dessa forma, o sistema de
79 avaliação computadorizada do sêmen (CASA) tem mostrado ser ferramenta útil na
80 avaliação cinética dos espermatozoides, mostrando grande potencial para prever a
81 fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de movimentação das células
82 com a capacidade de fertilizar oócitos (COX et al., 2006).

83 Outra técnica é a ultrassonográfica em modo B dos órgãos reprodutivos, que vem
84 sendo usada rotineiramente, pois é uma técnica segura e não invasiva para a identificação
85 de um parênquima testicular normal (MORELL, 2020). A ultrassonografia Doppler
86 tornou-se o método de escolha para avaliar o suprimento sanguíneo de vários órgãos. É
87 uma das técnicas mais simples e precisas para estimar o fluxo sanguíneo, pois combina
88 dados relativos à anatomia e aos parâmetros dinâmicos do fluxo (STRINA et al., 2016).

89 Na medicina veterinária, alguns estudos descreveram o método para o padrão de
90 pulsação de onda no cão (GUMBSCH; GABLER; HOLZMANN, 2002; ZELLI et al.,
91 2013) e no cavalo (POZOR, 2002; POZOR, 2007), mas a aplicabilidade dessas técnicas
92 para avaliar a produção de esperma e atividade testicular recebeu atenção limitada. Assim,
93 o presente estudo objetivou avaliar a qualidade espermática em touros CPD e Nelore em
94 diferentes períodos climáticos com o auxílio da análise dos parâmetros de onda de pulso
95 do ultrassom doppler juntamente com a análise cinética espermática.

96 **Material e Métodos**

97 *Comitê de Ética*

98 Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram realizados segundo
99 o Conselho Ético de Uso Animal – CEUA, já submetidos ao Comitê de Ética e
100 Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA-UFPI) e aprovado com
101 o registro nº 598/19.

102 *Animais e dados meteorológicos*

103 Foram utilizados 12 touros, sendo seis da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus*
104 *taurus*), e seis da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre 24 e 36 meses, com
105 escore corporal, 3,5 em uma escala variando de 1 (extremamente magro) a 5 (muito
106 obeso). Sendo os CPD oriundos do Campo Experimental da EMBRAPA localizado no
107 município de Campo Maior – PI, com coordenadas de Latitude 4° 55' 1,7" Sul,

108 e Longitude 42° 3' 33,4" Oeste, enquanto os Nelore foram provenientes da Fazenda
109 Vitória localizada no município de Brasileira – PI, com coordenadas de Latitude 4° 07'
110 51" Sul e Longitude 41° 46' 55" Oeste. O clima na região é classificado como tropical
111 subúmido (INMET, 2021), com temperaturas entre o máximo de 35°C e o mínimo de
112 23°C nos meses secos, e com o conjunto de dados meteorológicos dos últimos cinco anos
113 na região foram definidos os períodos mais amenos e mais quentes, respectivamente de
114 fevereiro a abril e de agosto a outubro. Além desses parâmetros ambientais registrados,
115 foram mensurados ao longo do experimento, a precipitação pluviométrica e a umidade
116 relativa do ar. Foram formados quatro grupos experimentais, contemplando as duas raças
117 e os dois períodos do ano (chuvoso e seco). Os animais foram mantidos sob o mesmo
118 sistema de manejo, recebendo suplementação mineral e água a vontade. Todos os animais
119 selecionados para a pesquisa foram escolhidos de acordo com os parâmetros
120 estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), valorizando
121 a inspeção e palpação dos órgãos que compõem o sistema genital dos reprodutores.

122 *Exame de US Doppler de onda de pulso*

123 Todos os animais foram submetidos à avaliação testicular através da
124 ultrassonografia com tecnologia Doppler. Foi utilizado o aparelho da marca Mindray,
125 modelo Z6 Vet equipada com um transdutor retal e/ou microconvexa (6,5-7,5 MHz),
126 tanto para o modo B como para a doppler. Para o exame de ultrassom, o touro foi contido
127 para que a região escrotal fosse explorada, sem a necessidade de administração de
128 sedativos. A pele escrotal foi limpa e gel ultrassonográfico foi aplicado para aumentar a
129 qualidade da imagem. As configurações da máquina permaneceram inalteradas durante o
130 exame. O transdutor foi posicionado no cordão espermático com orientação horizontal
131 para examinar a artéria do cordão espermático e a artéria testicular. A velocidade sistólica
132 de pico (PS, cm/s), a velocidade diastólica final (ED; cm/s) e o índice resistivo (RI) e o
133 índice de pulsatilidade (PI), que foram automaticamente calculados no pacote de
134 algoritmos fornecido no ultrassom.

135 *Coleta e avaliação imediata do sêmen*

136 Foram coletados seis ejaculados por touro, com intervalo mínimo de sete dias entre
137 os ejaculados, utilizando um eletroejaculador automático (Biocon ® Soluções para
138 Biotecnologia, Uberaba, Brasil), totalizando 72 ejaculados, 36 ejaculados por raça. Os
139 ejaculados foram coletados em tubos coletores graduados, acoplados a funis plásticos

140 previamente aquecidos em estufa mantida a 37°C. O sêmen coletado foi imediatamente
141 avaliado conforme metodologia proposta por Fonseca et al. (1992), contemplando as
142 variáveis volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade total e do vigor espermático. O
143 turbilhonamento (movimento em massa) foi avaliado com auxílio de um microscópio
144 binocular, em aumento de 100x. Para isso, uma gota de sêmen foi colocada sobre uma
145 lâmina previamente aquecida a 37°C e classificada de acordo com o movimento
146 espermático, em escala de 0 a 5. Posteriormente, utilizando nova alíquota de sêmen entre
147 lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, sob aumento de 400x, foram
148 classificados a motilidade (percentual de espermatozoides com movimento progressivo
149 retilíneo) e o vigor espermático (intensidade do movimento dos espermatozoides),
150 avaliado em escala de 0 a 5. Para avaliação das características morfológicas dos
151 espermatozoides, uma alíquota de sêmen de cada ejaculado foi acondicionada em
152 ependorff contendo 1,0 ml de solução formol salina tamponada (HÁNCOCK, 1957). Uma
153 alíquota do ejaculado, diluída em formol salino (diluição de 1:200) foi utilizado para
154 avaliação da concentração e morfologia espermática. A concentração foi realizada por
155 meio da técnica Câmara de Neubauer e o resultado expresso em número de
156 espermatozoides por mm³. A análise da morfológica espermática foi realizada por meio
157 da técnica de “Câmara úmida” e os defeitos classificados em maiores e menores de acordo
158 com a Blom (1971). Após a avaliação, cada ejaculado foi diluído com AndroMed®
159 (REF.: 13503/0200), para posterior criopreservação.

160 *Avaliação da cinética espermática*

161 A cinética espermática foi avaliada por meio do *Computer Assisted Sperm*
162 *Analysis* (CASA). O CASA é um sistema de microscopia óptica de contraste de fase
163 (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação estroboscópica, e uma fase quente
164 a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler Visão Technologie™ A312FC, Ahrensburg,
165 Alemanha) e um computador com o analisador de sêmen Classe™ software (Microptics,
166 SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis avaliadas foram: velocidade
167 curvilínea (VCL - µm/s), velocidade em linha reta (VSL - µm/s), velocidade média do
168 percurso (VAP-µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), deslocamento
169 lateral de cabeça (ALH - µm), oscilação (WOB - %) e frequência de batimento cruzado
170 (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

171

172 *Análise estatística*

173 Para análise dos dados foram utilizadas médias e desvio padrão, além do teste
 174 Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguem distribuição Normal. Para comparar as
 175 médias entre as raças e entre os períodos foi usado o teste t de Student e o teste não-
 176 paramétrico U de Mann-Whitney. Os dados foram tabulados e analisados no IBM
 177 Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0. O nível de significância adotado
 178 foi $p \leq 0,05$. Para apresentação dos resultados utilizou-se tabelas e gráficos.

179 **Resultados**

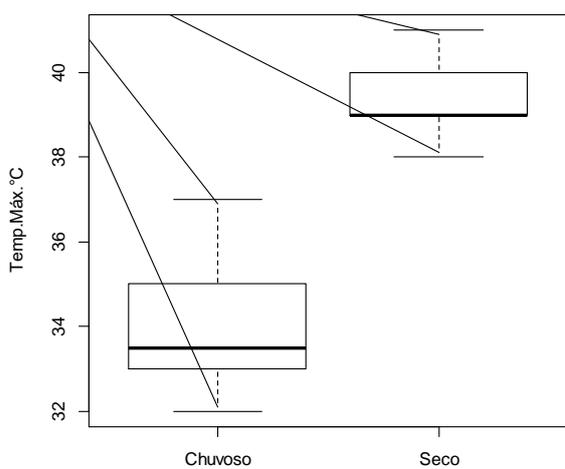
180 Foi analisada a temperatura, umidade e chuva acumulada nos períodos das coletas
 181 e análises andrológicas realizadas nos animais (Tabela 1). Constatou-se que as mudanças
 182 climáticas foram nitidamente significativas para os parâmetros explorados. Pode-se notar
 183 também que a amplitude de variação de temperatura máxima e mínima dentro do período
 184 seco é maior quando comparada ao período chuvoso e que não houve um dia se quer de
 185 precipitação nas datas estabelecidas para a coleta de dados no período seco, corroborando
 186 com a devida classificação.

187 **Tabela 1.** Parâmetros meteorológicos referentes aos dias das realizações das coletas seminais na
 188 região Meio-Norte do Brasil, referentes ao período chuvoso (fevereiro a abril) e período seco
 189 (agosto a outubro).

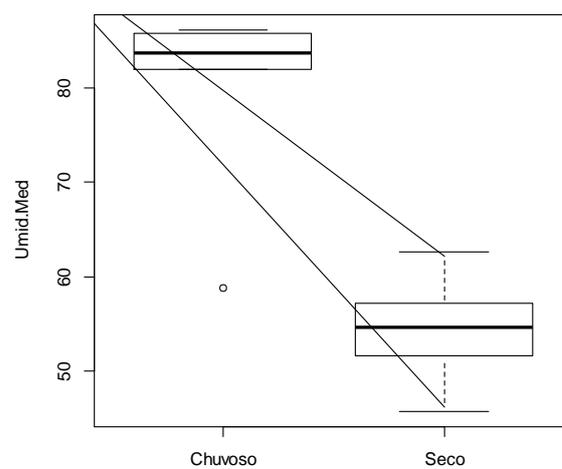
	Tempo		p-valor
	Chuvoso (n=5)	Seco (n=6)	
	Média ± DP	Média ± DP	
Temp. Máx.(°C)	33,40 ± 1,14	39,00 ± 1,41	<0,001^a
Temp, Min,(°C)	25,04 ± 0,57	23,10 ± 2,10	0,055 ^b
Temp, Med,(°C)	27,78 ± 0,67	30,50 ± 1,31	0,002^a
Umid, Med,(%)	84,22 ± 1,95	55,12 ± 5,89	0,006^b
Chuva acumulada 24h (mm)	26,96 ± 54,63	0,00 ± 0,00	0,011^b

190 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. P-valor com letras sobrescritas diferentes representa
 191 o teste utilizado ^at de Student; ^bU de Mann-Whitney. Valores significativos estão em negrito.

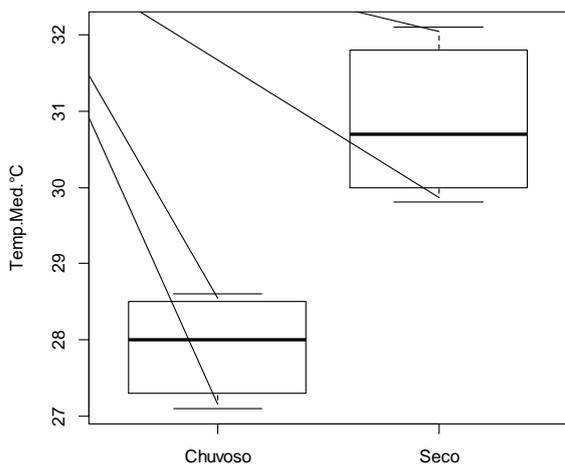
192 Dentro do gráfico de temperatura média, pode-se observar que a variabilidade é
 193 maior dentro do período seco em comparação ao período chuvoso. Nota-se também que
 194 não houve acúmulo de chuva no período de coleta de dados no período seco, assim como
 195 a umidade se mostra significativamente mais elevada que o período seco, ratificando a
 196 validade de comparação entre os dois períodos.



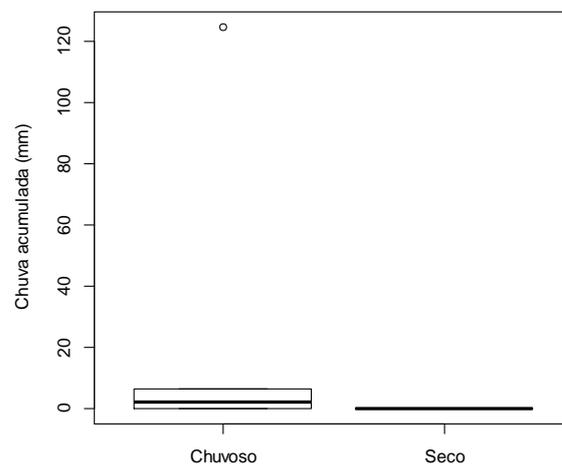
197



199



198



200

201

202 **Gráfico 1.** Gráfico tipo Box Plot referente aos parâmetros meteorológicos dos períodos seco e
 203 chuvoso nas datas das coletas seminais das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas

204 Ao analisar os dados seminais imediatos (Tabela 2), notou-se que quando
 205 comparado dentro da mesma raça em diferentes períodos sazonais o volume do ejaculado
 206 teve uma queda significativa ($P < 0,05$) do período mais ameno para o período com
 207 temperaturas mais altas, tanto para o CPD como para o Nelore. Porém isso não prediz
 208 uma queda na qualidade espermática, pelo contrário, pode-se observar um aumento
 209 significativo ($P < 0,05$) da motilidade e vigor dos animais CPD no período seco, não
 210 sendo observado esse aumento no Nelore. É interessante notar também que os defeitos
 211 espermáticos menores foram significativamente menores ($P < 0,05$) no CPD no período
 212 seco e, mesmo o p-valor não se apresentando significativo, obtiveram-se valores
 213 expressivos na queda dos defeitos maiores e totais. O Nelore também apresentou valores
 214 significativos na diminuição dos defeitos maiores no período seco ($P < 0,05$).

215 Quando comparamos os dados seminais imediatos (Tabela 2) entre as raças
 216 constatou-se que o Nelore se sobressaiu ($P < 0,05$) no parâmetro vigor dentro do período
 217 chuvoso, sendo que no período seco para a mesma medida as médias foram muito
 218 semelhantes. Ademais foi observado também uma diferença significativa ($P < 0,05$)
 219 ligada aos defeitos menores, sendo que CPD apresentaram uma média alta desses defeitos
 220 em comparação aos Nelore, que pelo valor apresentado pode estar associado a algum
 221 resultado outlier dentro das análises.

222 **Tabela 2.** Dados seminais imediatos das raças bovinas tropicalmente adaptadas e exóticas no
 223 período chuvoso e seco.

	Tempo		p-valor
	Chuvoso	Seco	
	Média ± DP	Média ± DP	
Volume			
CPD	7,50 ± 3,21	3,21 ± 1,29	<0,001 ^b
Nelore	6,25 ± 1,69	4,04 ± 1,25	0,001 ^a
p-valor	0,245 ^a	0,122 ^a	
Turbilhonamento			
CPD	2,08 ± 1,08	2,67 ± 1,78	0,342 ^a
Nelore	2,33 ± 0,89	2,08 ± 1,73	0,660 ^a
p-valor	0,588 ^b	0,426 ^b	
Motilidade			
CPD	74,58 ± 11,96	83,75 ± 7,72	0,041 ^b
Nelore	82,92 ± 10,76	84,17 ± 7,93	0,901 ^b
p-valor	0,064 ^b	0,822 ^b	
Vigor			
CPD	3,00 ± 0,60	3,75 ± 0,62	0,004 ^b
Nelore	3,67 ± 0,49	3,92 ± 0,51	0,244 ^b

p-valor	0,010^b	0,625 ^b	
FS Diluição			
CPD	200,00 ± 0,00	200,00 ± 0,00	1,000 ^b
Nelore	200,00 ± 0,00	200,00 ± 0,00	1,000 ^b
p-valor	1,000 ^b	1,000 ^b	
Concentração			
CPD	134,58 ± 73,33	172,75 ± 96,94	0,288 ^a
Nelore	96,50 ± 80,37	114,42 ± 88,00	0,436 ^b
p-valor	0,238 ^a	0,122 ^a	
Defeitos maiores			
CPD	1,56 ± 1,24	1,19 ± 1,00	0,550 ^b
Nelore	2,73 ± 2,73	1,19 ± 1,00	0,138 ^b
p-valor	0,334 ^b	1,000 ^b	
Defeitos menores			
CPD	6,36 ± 3,04	3,33 ± 2,68	0,024^b
Nelore	5,88 ± 7,17	3,33 ± 2,68	0,451 ^b
p-valor	0,114 ^b	1,000 ^b	
Defeitos totais			
CPD	7,64 ± 3,65	4,13 ± 2,88	0,020^a
Nelore	8,38 ± 7,21	4,13 ± 2,88	0,093 ^b
p-valor	0,558 ^b	1,000 ^b	

224 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. P-valor com letras sobrescritas diferentes representa
 225 o teste utilizado ^at de Student; ^bU de Mann-Whitney. Valores significativos estão em negrito nas colunas e
 226 linhas.

227 Ao analisar a cinética espermática pós-descongelção (Tabela 3) entre as raças, os
 228 valores de velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade
 229 média de percurso (VAP) e retilinearidade (STR) dos espermatozoides foram
 230 significativos ($P < 0,05$) em favorecimento ao CPD. Já a raça Nelore obteve um
 231 desempenho significativo ($P < 0,05$) relacionado a frequência de batimentos de cauda
 232 (BTF).

233 Ao analisar a cinética espermática dentro de uma mesma raça em períodos
 234 diferentes, notou-se que a raça Nelore foi a única que teve variações significativas entre
 235 o período chuvoso e seco. A oscilação (WOB) foi significativamente maior ($P < 0,05$) no
 236 período seco, enquanto a frequência de batimentos de cauda (Hz) foi maior ($P < 0,05$)
 237 dentro do período chuvoso.

238

239

240

241 **Tabela 3.** Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados das raças bovinas
 242 tropicalmente adaptadas e exóticas no período chuvoso e seco.

	Tempo		p-valor
	Chuvoso	Seco	
	Média ± DP	Média ± DP	
VCL (µm/s)			
CPD	84,8 ± 16,9	76,4 ± 8,3	0,262
Nelore	68,2 ± 15,5	56,1 ± 11,9	0,144
p-valor	0,109	0,018	
VSL (µm/s)			
CPD	37,2 ± 4,8	37,4 ± 3,7	0,81
Nelore	25,1 ± 11,4	23,2 ± 7,0	0,465
p-valor	0,037	0,011	
VAP (µm/s)			
CPD	45,7 ± 6,0	47,9 ± 4,8	0,337
Nelore	38,2 ± 9,8	32,8 ± 8,9	0,273
p-valor	0,109	0,018	
LIN (%)			
CPD	44,6 ± 5,7	49,4 ± 7,0	0,262
Nelore	35,4 ± 12,4	41,0 ± 6,1	0,465
p-valor	0,200	0,082	
STR (%)			
CPD	81,5 ± 4,2	78,1	0,128
Nelore	62,8 ± 19,6	70,4	1,000
p-valor	0,045	0,028	
WOB (%)			
CPD	55,9 ± 8,3	57,9 ± 5,2	0,584
Nelore	54,6 ± 4,8	63,0 ± 6,4	0,025
p-valor	0,575	0,200	
ALH (µm)			
CPD	2,8 ± 1,9	3,0 ± 0,7	1,000
Nelore	4,2 ± 0,7	3,9 ± 0,8	0,422
p-valor	0,200	0,142	
BCF (Hz)			
CPD	8,8 ± 6,1	8,6 ± 0,8	1,000
Nelore	12,8 ± 1,9	10,5 ± 1,1	0,024
p-valor	0,109	0,013	

243 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP). Valores de média com letras minúsculas
 244 diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste U de Mann-Whitney.
 245 **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em linha reta; **VAP** – velocidade média de percurso; **LIN**
 246 - linearidade; **STR** - retilinearidade; **WOB** – Oscilação; **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da
 247 cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.

248 Nos parâmetros da onda de pulso do US Doppler (Tabela 4), as características do
 249 tempo e as raças foram normalmente distribuídos ($P > 0,05$). Todos os valores (OS, ED,
 250 RI e PI) analisados não tiveram uma diferença significativa com a alteração climática (P
 251 $> 0,05$). Ocorrendo o mesmo resultado na comparação entre as raças estudadas.

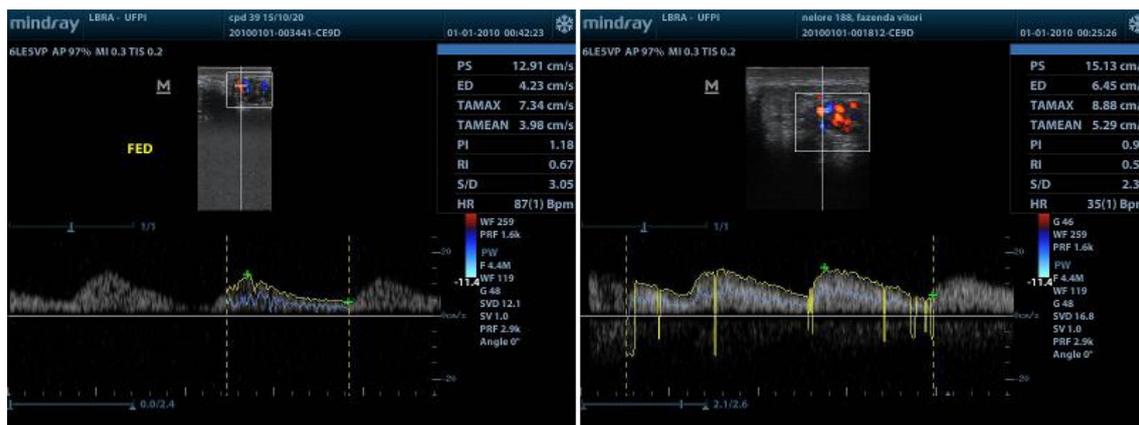
252 Nenhuma mudança foi observada em qualquer um dos animais avaliados com as
 253 varreduras de ultrassom. No Visão Doppler, a artéria suprategicular (no funículo
 254 espermático) foi facilmente observada; embora não tenha sido difícil coletar a
 255 informação, exibiu uma tortuosa anatomia padrão e ondas com características
 256 monofásicas (Figura 1).

257 **Tabela 4.** Dados de onda de pulso do US Doppler das raças bovinas tropicalmente adaptadas e
 258 exóticas no período chuvoso e seco.

	Tempo		p-valor
	Chuvoso	Seco	
	Média ± DP	Média ± DP	
Pisco sistólico (PS) (cm/s)			
CPD	11,87 ± 2,53	12,68 ± 6,74	0,854
Nelore	19,10 ± 5,95	18,43 ± 4,89	0,851
p-valor	0,099	0,208	
Diástole final (ED) (cm/s)			
CPD	6,16 ± 1,48	6,45 ± 1,90	0,843
Nelore	13,75 ± 7,17	14,33 ± 7,09	0,901
p-valor	0,129	0,117	
Índice de pulsatilidade (PI)			
CPD	0,72 ± 0,36	0,50 ± 0,22	0,420
Nelore	0,44 ± 0,32	0,34 ± 0,30	0,632
p-valor	0,296	0,461	
Índice de resistivo (RI)			
CPD	0,46 ± 0,19	0,37 ± 0,37	0,716
Nelore	0,30 ± 0,21	0,25 ± 0,21	0,741
p-valor	0,328	0,593	

259 Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Valores de média em negrito na mesma coluna ou
 260 linha indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste t de Student.

261



262

263 **Figura 1:** Análise das ondas de pulso em US Doppler do funículo espermático de touros da raça
 264 CPD e Nelore, representado por padrões de onda.

265

266 **Discussão**

267 Os parâmetros de onda de pulso da artéria testicular foram sugeridos como um
 268 procedimento útil no processo de avaliação da perfusão do testículo, pois o testículo
 269 recebe vascularização exclusivamente através desse vaso. A artéria testicular faz parte do
 270 cordão espermático, onde o grande enovelado de vasos dispersa o calor, reduzindo a
 271 temperatura de trabalho do testículo (KASTELIC, COOK, COULTER;1997).

272 Já a análise da cinética espermática detecta mudanças sutis em diversos
 273 parâmetros espermáticos e entra como forma de contribuir e somar com os achados
 274 ultrassonográficos. Nos últimos anos, relatos utilizando esse sistema têm aumentado
 275 significativamente, e a principal espécie no qual tem sido utilizado é a humana,
 276 principalmente correlacionando a qualidade espermática com a fertilidade
 277 (VERSTEGEN et al., 2002).

278 A ativação dos mecanismos termorregulatórios é resultante de uma maior
 279 necessidade de suprimento sanguíneo, que desempenha um papel importante na troca de
 280 calor no plexo pampiniforme (KASTELIC, 2014). Este achado foi verificado por Barros
 281 e colaboradores (2018) que observaram o maior fluxo de sangue testicular com aumento
 282 do ambiente temperatura. No nosso estudo esse maior suprimento sanguíneo não foi
 283 observado de modo significativo nas duas raças trabalhadas no período seco, porém
 284 numericamente as médias mostram um aumento no PS e ED, em razão disso sugere-se
 285 que esses animais são adaptados à temperatura local.

286 Acreditava-se que com o aumento da temperatura, com hiperemia local houvesse
287 o aumento nos níveis de cortisol interferindo na espermatogênese realizada por
288 mecanismos endócrinos, especificamente na liberação da produção de testosterona
289 (PRABHAKAR; CHIMBOMBI; MALMGREN; FREDRIKSSON; MADEJ, 1990;
290 WELSH; JOHNSON, 1981), porém houve uma diminuição na produção de cortisol, isso
291 pode ser entendido pela não alteração do fluxo sanguíneo do período chuvoso para o seco,
292 corroborando com fato de que animais que vivem em regiões com clima tropical se
293 adaptam a ele (BRITO, et al., 2003).

294 O aumento na temperatura ambiental resulta em perda ou dano do equilíbrio
295 homeostático de termorregulação testicular, levando a várias mudanças fisiológicas. No
296 entanto, quando o fator de estresse cessa, o organismo busca recuperá-lo com a maior
297 agilidade possível (SETCHELL, 2006). De acordo com os resultados obtidos nesse
298 estudo os dados biométricos (Tabela 2) não mudaram com a alteração climática, assim
299 como outros estudos mostraram que a biometria testicular de touro não muda com a
300 estação do ano no Brasil (BARBOSA et al., 1991; CALDAS et al., 1999; PINHO et al.,
301 2001; e UNANIAN et al., 2000).

302 A melhora da motilidade e do vigor no sêmen de touros europeus durante o verão,
303 assim como a menor contagem de espermatozoides com defeitos (MENEGASSI et al,
304 2016), corroborando com o resultado da Tabela 3, isso mostra a adaptação desses animais
305 ao ambiente em que o experimento foi realizado.

306 Ao analisar os dados seminais imediatos correlacionando as raças, o Nelore
307 apresentou maior vigor durante o período chuvoso quando comparado ao CPD, diferindo
308 do descrito por Rahka (1971) e Igboeli e colaboradores (1991), que encontraram melhores
309 resultados no verão. Essas variações de qualidade seminal podem ser influenciadas por
310 fatores como por exemplo a idade do animal (FUERST-WALTL et al., 2006; BALIC et
311 al., 2012; VINCE et al., 2018) e o estado nutricional (MONTESINOS et al, 2014),
312 variáveis essas controladas no nosso estudo. Já as mudanças no peso e na origem do
313 sêmen (fresco ou congelado) não interagem significativamente com os resultados
314 segundo Teixeira e colaboradores (2011), existindo ainda a possibilidade de o estresse ao
315 calor não afetar o esperma epididimal durante a espermatogênese (MEYERHOEFFER et
316 al., 1985).

317 A habilidade do espermatozóide para migrar através do trato reprodutivo da fêmea
318 e penetrar no oócito depende da resistência exercida pela secreção presente no trato
319 genital feminino e do potencial hidrodinâmico conferido pela curvatura flagelar. Sua
320 força de propulsão é definida pelas propriedades cinemáticas dessas células, o que pode
321 levar a diferenças na eficiência de migração entre espermatozoides de alguns machos
322 (COX et al., 2006).

323 Versteegem e colaboradores (2002) utilizando o CASA como técnica aplicada à
324 prática andrológica veterinária verificaram que os valores de VAP, VSL e VCL são
325 significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos
326 fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50%,
327 podendo assim correlacionar com os valores encontrados nos espermatozoides da raça
328 CPD predominantemente no período seco. Parâmetros como LIN e BCF quando
329 elevados, apresentaram melhor migração e penetração no muco cervical (MORTIMER,
330 2000), podendo também ser correlacionado com a taxa de prenhez (LIU et al., 1991),
331 tendo o Nelore uma frequência de batimentos de cauda significativamente maior que o
332 CPD dentro do período chuvoso.

333 Os espermatozoides de *Bos indicus* são comprovadamente menores e mais
334 elípticos comparado ao de *Bos taurus*, no entanto já foi demonstrado que mesmo
335 submetidos a diferentes períodos climáticos, os touros sabidamente menos adaptados a
336 termorregulação testicular não sofreram alterações na morfometria espermática (BRITO
337 et al., 2002; BELETTI et al., 2005). Os touros, seja taurinos ou zebuínos diferem
338 amplamente em todas as variáveis de velocidade (VERSTEGEM et al., 2002), logo, a
339 relação de forma espermática não deve ser engessada para classificação o potencial de
340 fertilização.

341 Para tanto, foi visto que o espermatozoide do CPD foi melhor nas variáveis de
342 velocidade (VAP, VSL e VCL) e já foi comprovado que espermatozoides hiperativados
343 tiveram uma porcentagem média significativamente maior de cabeças normais e
344 acrossoma pequeno e uma porcentagem significativamente menor de cabeças grandes e
345 redondas (Green et al., 2003) corroborando com a ideia de que não pode associar o grau
346 de fertilidade à forma do espermatozoide. Assim como, pode inferir o melhor
347 desempenho desses animais tropicalmente adaptados para a região tropical úmida do
348 Meio-Norte do Brasil.

349 O índice de oscilação (WOB) é descrito como sendo inversamente proporcional
350 ao STR (PERUMAL et al., 2014), parâmetro que se correlaciona positivamente com a
351 taxa de fecundidade (MATOS et al., 2008). Nesse contexto, um alto índice de oscilação
352 (WOB) está associado à elevação do movimento curvilíneo, em oposição ao movimento
353 progressivo, o que explica a diminuição da qualidade e da fertilidade do sêmen congelado
354 (SILVA et al., 2011), apontando assim a menor adaptabilidade do Nelore na mudança do
355 período chuvoso para o seco, não acontecendo o mesmo com o CPD, reforçando seu título
356 de espécie tropicalmente adaptada.

357 **Conclusão**

358 Confirmam que o mecanismo termorregulador dos animais que estão adaptados
359 ao clima tropical é eficiente, mantendo a homeostase corporal e diminuindo as variações
360 fisiológicas frente as mudanças de temperatura. Acrescenta também que apesar da grande
361 variação morfológica do espermatozoide dentro da espécie taurina,

362 a mudança de temperatura não é capaz de interferir no desempenho de animais
363 adaptados (do grupo CPD). Por fim, resultados significativos na cinética espermática
364 foram obtidos em favorecimento a raça CPD no período seco quando comparados a raça
365 Nelore, demonstrando sua real adaptabilidade ao ambiente e como consequência à
366 reprodução, validando a importância dos estudos relacionados a raça CPD.

367 **Referencias**

368 ADEYEYE, A. A. et al. Cryptorchidism among indigenous breeds of bulls in a semi-arid
369 region of Nigeria. **Macedonian Veterinary Review**, v. 36, n. 2, p. 123-128, 2013.

370 ADWELL, CMQ Barros et al. Arterial blood flow is the main source of testicular heat in
371 bulls and higher ambient temperatures significantly increase testicular blood
372 flow. **Theriogenology**, v. 116, p. 12-16, 2018.

373 BELETTI, M. E.; DA FONTOURA COSTA, L.; VIANA, M. P. A comparison of
374 morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in
375 Brazil. **Animal reproduction science**, v. 85, n. 1-2, p. 105-116, 2005.

376 BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of the
377 bull. **Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 673-677, 1988.

- 378 BRITO, L. F. C. et al. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm
379 production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal**
380 **reproduction science**, v. 70, n. 3-4, p. 181-190, 2002.
- 381 BRITO, L. F. C. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality,
382 and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. **Animal**
383 **reproduction science**, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, 2003.
- 384 COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.
385 Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm
386 migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.
- 387 GUMBSCH, P.; HOLZMANN, A.; GABLER, C. Colour-coded duplex sonography of
388 the testes of dogs. **Veterinary Record**, v. 151, n. 5, p. 140-144, 2002.
- 389 GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of climate on reproduction in cattle. **Journal of Dairy**
390 **Science**, v. 68, n. 6, p. 1568-1578, 1985.
- 391 KASTELIC, J. P.; COOK, R. Byrne; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum,
392 testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient
393 temperatures. **Animal reproduction science**, v. 45, n. 4, p. 255-261, 1997.
- 394 KASTELIC, John P. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in
395 bulls. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 20-25, 2013.
- 396 KASTELIC, John P. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v. 81,
397 n. 1, p. 18-23, 2014.
- 398 MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G. et al. Análise computarizada de
399 espermatozóides: revisão de literatura (computer-assisted sperm analysis (CASA): a
400 review). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.32, p.225-232, 2008.
- 401 MORRELL, Jane M. Heat stress and bull fertility. **Theriogenology**, v. 153, p. 62-67,
402 2020.
- 403 PARKINSON, T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: correlations with
404 environmental temperature. **The Veterinary Record**, v. 120, n. 20, p. 479-482, 1987.

- 405 PERUMAL, P.; SRIVASTAVA, S.K.; GHOSH, S.K. et al. Computer-assisted sperm
406 analysis of freezable and nonfreezable Mithun (*Bos frontalis*) semen. **J. Anim.**, v.2014,
407 p.1-6, 2014.
- 408 POZOR, M. A.; MCDONNELL, S. M. Doppler ultrasound measures of testicular blood
409 flow in stallions. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 437-440, 2002.
- 410 POZOR, Malgorzata A. Evaluation of testicular vasculature in stallions. **Clinical**
411 **Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 271-277, 2007.
- 412 PRABHAKAR, Jetty et al. Effects on testosterone and LH concentrations of induced
413 testicular degeneration in bulls. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 31, n. 4, p. 505, 1990.
- 414 ROJAS-DOWNING, M. Melissa et al. Climate change and livestock: Impacts,
415 adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, v. 16, p. 145-163, 2017.
- 416 SAMIR, Haney et al. Effect of seasonality on testicular blood flow as determined by color
417 Doppler ultrasonography and hormonal profiles in Shiba goats. **Animal reproduction**
418 **science**, v. 197, p. 185-192, 2018.
- 419 SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. **Animal Reproduction**
420 **(AR)**, v. 3, n. 2, p. 81-91, 2018.
- 421 SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M. et al. In vitro and in vivo evaluation of
422 ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and
423 reduced glutathione. **Reprod. Dom. Anim.**, v.46, p.874-881, 2011.
- 424 SINGLA, M. et al. Breeding soundness evaluation of stall-fed bucks using
425 ultrasonography. **Indian J. Anim. Sci**, v. 87, p. 584-586, 2017.
- 426 STRINA, A. et al. Annual variations in resistive index (RI) of testicular artery, volume
427 measurements and testosterone levels in bucks. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25,
428 n. 2, p. 409-413, 2016.
- 429 TIBARY, Ahmed; BOUKHLIQ, R.; EL ALLALI, K. Ram and Buck breeding soundness
430 examination. **Rev. Mar. Sci. Agr. Vét**, v. 6, p. 241-255, 2018.
- 431 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen
432 analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-
433 179, 2002.

434 WELSH JR, THOMAS H.; JOHNSON, BRYAN H. Stress-induced alterations in
435 secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone, and testosterone in
436 bulls. **Endocrinology**, v. 109, n. 1, p. 185-190, 1981.

437 ZELLI, R. et al. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as
438 a predictor of spermatogenesis in the dog. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p.
439 632-637, 2013.

440

441

442

443

444

445

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo permitem concluir que a ocorrência de estresse pelo calor das raças bovinas Curraleiro Pé-Duro e Nelore em diferentes períodos climáticos do ano ocasionou respostas fisiológicas significativas, porém não foi suficiente para prejudicar a qualidade do sêmen dos animais, a qual se manteve constante e satisfatória no período chuvoso e seco. Características relacionadas com o conforto térmico animal, como a temperatura do ar, humidade e chuva acumulada foram parâmetros considerados para as correlações com análises seminais, porém mesmo com as diferenças significativas entre os períodos chuvoso e seco, os animais se mostraram adaptados às variações impostas pelo ambiente no qual cresceram.

As principais diferenças entre as raças no tocante à adaptabilidade ao ambiente térmico foram observadas em características de vigor e defeitos menores, mostrando que touros Nelore foram superiores aos CPD no período chuvoso, porém a melhora desses dados seminais nos Curraleiros ao adentrar o período seco é muito significativa, mostrando sua adaptabilidade às épocas mais quentes. Assim como demonstrado através do CASA que a cinética espermática da raça CPD se manteve ou melhorou com a entrada no período seco, corroborando com a ideia de adaptação ao ambiente em que esses animais vivem.

O aprofundamento nas pesquisas referente ao gado CPD se transformará em um recurso genético, um banco de informações para a pecuária e para a ciência e somente o futuro poderá dizer sua real importância. É, portanto, uma reserva, tanto para a genética convencional como para trabalhos na área de biotecnologia da reprodução.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDELRAHMAN, M. A. et al. A review of Medical Doppler US. **J. Med. Ultrasound**, v. 26, p. 115-117, 2018.
- ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.
- AHIRWAR, M. K. et al. Scrotal infrared digital thermography predicts effects of thermal stress on buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Journal of thermal biology**, v. 78, p. 51-57, 2018.
- AITKEN, R. J.; SUTTON, M.; WARNER, P.; RICHARSON, D. W.; Relationship between the movements characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. **Reproduction and Fertility**, v.73, p.441-449, 1985.
- ANDREUCCI, R. 2002. Ensaio por ultra-som. 3ª edição. Editora Copyright, São Paulo, p.77.
- ARRUDA, P. R.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; ZAFFALON, G.; TARRAGÓ, O. F. B. Avaliação de sêmen fresco e congelado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM CAPRINOS E OVINOS, 1, 2007, Gravatá, PE. **Anais...** Gravatá, CAROATÁ GENÉTICA, 2007. CD ROOM.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Science Veterinariae**, v.31 (Suplemento), p. 226-227, 2003.
- AZEVÊDO, D. M. M. R. et al. Adaptabilidade de bovinos da raça Pé-Duro às condições climáticas do Semi-Árido do estado do Piauí. **Archivos de zootecnia**, v. 57, n. 220, p. 513-523, 2008.
- AZEVEDO, H. C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoleico e à lactoalbumina**. 2006, 195p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. A importância do exame andrológico em bovinos. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2005.

BATISTA, A. M.; SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M. M. P. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009.

BAUMGARD, L. H.; RHOADS J. R., Robert P. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 1, n. 1, p. 311-337, 2013.

BEEDE, D. K.; COLLIER, R. J. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. **J. Anim. Sci.**, v. 62: p. 543-554, 1986.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in the semen of group for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, 1958-1982. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.35, n.3, p.105-130, 1983.

BOLIGON, A. A.; ALBUQUERQUE, L. G.; RORATO, P. R. N. Associações genéticas entre pesos e características reprodutivas em rebanhos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 596-601, 2008.

BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic Doppler use for female reproduction management. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 1, p. 149-164, 2016.

BRITO, L. F. C. et al. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: Relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 511-528, 2004.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-10,1978.

- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 93-99, 2008.
- CARDOSO, C. et al. Heat tolerance in Curraleiro Pe-Duro, Pantaneiro and Nelore cattle using thermographic images. **Animals**, v. 6, n. 2, p. 9, 2016.
- CARVALHO, C. F. Ultrassonografia em pequenos animais. Editora ROCA, São Paulo, 2004, p.365.
- CARVALHO, G. M. C. et al. Avaliações fenotípicas da raça bovina Curraleiro Pé-duro do semiárido do Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 9-20, 2013.
- CARVALHO, J. H. Projeto de preservação do gado Pé-Duro. In: Seminário de Pesquisa Agropecuária do Piauí, 4. 1986. Teresina. **Anais**. Embrapa/UEPAE de Teresina. Teresina. p. 504- 522. 1986.
- CARVALHO, J. H.; MONTEIRO, F. C.; GIRÃO, R. N. Conservação do bovino pé-duro ou curraleiro: situação atual. **Embrapa Meio-Norte-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.
- CARVALHO, J.H.; GIRÃO, R.N. Conservação de recursos genéticos animais: a situação do bovino Pé-duro ou Curraleiro. **Anais do 2º Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe**. Sirgeal, Brasília, CD-Rom. 1999.
- CHACUR, M. G. M. et al. Influência da estação do ano nas características do sêmen e na concentração de hormônios em touros Nelore e Simental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 540-546, 2012.
- CHENOWETH, P. J.; BALL, L. Breeding soundness evaluation in bulls. In: MORROW, D.A. (Ed.) **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: Saunders Company: 1980, p.330-339.
- CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M; SOUZA, F. F; TEBET, J. M.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

COLETO, Z.F.; GUERRA M. M. P.; BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

CÔRTE, A. C. R.; HERNANDEZ, A. J. Termografia médica infravermelha aplicada à medicina do esporte. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 22, n. 4, p. 315-319, 2016.

DADOUNE, J. P.; DEMOULIN, A. Structure and functions of the testis. In: **Reproduction in mammals and man**. Ed. by THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. Paris: Ellipses. 1993.

DE KRETZER, D. M.; KERR, J. B. The cytology of testis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 837-932.

DENVIREDDY, R. V.; SWALUND, D. J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSON, M. H. T.; BISCHOF, J. C.; ROBERTS, K. P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 222-231, 2002.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1980, 446p.

DOMINGUES, O.; SANFORD, P.; MELLO, J.M.; MAIA, A. L. e COELHO, A.A. Preservação e seleção das raças nativas de gado do Nordeste. Fortaleza, Seção de Fomento Agrícola, 1956. 28 p.

EGITO, A. A.; FIORAVANTI, M. C. S.; GRATTAPAGLIA, D.; RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. Origem e diversidade genética materna de populações de bovinos da raça curraleira de diferentes regiões do Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, Córdoba, v. 1, p. 110-113, 2011.

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

ELIANDRA B., et al. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesq. agropec. bras.**, v.41, n.9, p.1443-1448, 2006.

ELLIOT R. L.; HEAD J. F. Medical infrared imaging in the twenty-first century. **Thermol Int.**, n. 9, v. 4, p. 111, 1999.

ENCARNACAO, R. O. Estresse e produção animal. **Embrapa Gado de Corte-Documentos (INFOTECA-E)**, 1986.

FAO. **Coping with climate change - The roles of genetic resources for food and agriculture**. Rome: 2015

FARROW, C. S. Ultra talk: beginners guide to the language of ultrasound. **Veterinary Radiology & Ultrasound.**, v. 33, p. 33-31, 1992.

FERNANDES, C. E.; MORAES, J. C. F. Avaliação clínica e exame de sêmen no touro. **Embrapa Pecuária Sul-Livro científico (ALICE)**, 2010.

FERNÁNDEZ, A.; VIANA, J. L.; IGLESIAS BLANCO, A.; SÁNCHEZ, L. Genetic variability and phylogenetic relationship between ten native cattle breeds from Galicia and the North of Portugal. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, n. 177, p. 61-71, 1998.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 139-144, 2005.

FONSECA, V. O.; SANTOS, N. R.; MALINSKI, P. R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 36-39, 1997.

FONSECA, V.O.; SANTOS, N.R.; MALINSKI, P.R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.2, p.36-39, 1997a.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, N.R.; MIES FILHO, A. et al. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992, 79p

FRENEAU, G. E., et al. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, p. 1107–1115, 2006.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciê. Agr. Saúde. FEA, Andradina**, v. 2, n. 2, p. 66–70, 2002.

GEORGE, W.D.; GODFREY, R.W.; KETRING, R.C.; VINSON, M.C.; WILLARD, S.T. Relationship among eye and muzzle temperatures measured using digital infrared

thermal imaging and vaginal and rectal temperatures in hair sheep and cattle. **J. Anim. Sci.** v. 92, p. 4949–4955, 2014.

GONZÁLEZ, F. H. D. Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária. **Porto Alegre: UFRGS**, v. 83, 2002.

GOSLING, R. G., KING, D. H. Arterial assessment by Doppler-shift ultrasound. **Proceeding of the Royal Society of Medicine** v. 67, p. 447–449, 1974.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practices**, v. 12, p. 119–130, 1996.

GUNZEL-APEL, A. R., MOHRKE, C., POULSEN NAUTRUP, C. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland. Physiological and pathological findings. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 236–240, 2001.

HANCOCK, K.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H. et al. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v. 16, n. 2, p. 119-123, 2005.

IBGE, Diretoria. Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da Pecuária**, 2006.

JONES, K.H.; SENEFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate – propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal reproduction science**, v. 45, n. 4, p. 255-261, 1997.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 271-282, 1997.

KHAN, H., KHAN, M. F., JAN, S. U., ULLAH, N. Effect of aluminium metal on glutathione (GSH) level in plasma and cytosolic fraction of human blood. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 13-18, 2011.

KOOTS, K. R.; GIBSON, J. P. Realized sampling variances of estimates of genetic parameters and the difference between genetic and phenotypic correlations. **Genetics**, v. 143, n. 3, p. 1409-1416, 1996.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

LAMBERT, B. The frequency of mumps and of mumps orchitis and the consequences for sexuality and fertility. **Acta Genetica et Statistica Medica**, v. 2, p. 1-166, 1951.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A. Microtubular defect in equine spermatozoa associated with infertility. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 6, p. 487-489, 1997.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979.

LLOYD-JONES, Janet L. et al. Use of thermography for functional evaluation of stallion scrotum and testes. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 6, p. 488-494, 2015.

LUQUE, M. C. A.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural characterization of Zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2006.

MAGALHÃES, Ana Fabrícia Braga et al. Genomic selection for meat quality traits in Nelore cattle. **Meat science**, v. 148, p. 32-37, 2019.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUZA, D. B.; RODELO, R. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v. 85, p. 85-90, 2009.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase**. 2006, 165p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; BALASCH, S.; MOCÉ-E.; SILVESTRE, M. A.; GOMEZ, E. A., VICENTE, J. S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Criobiology**, v. 52, p. 295-304, 2006.
- MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 223-235, 2002.
- MAZUR, P. **Basic concepts in freezing cells**. Oak Ridge National Lab., TN (USA), 1985.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, 327-344, 2002.
- MELLO, R. R. C. Puberdade e maturidade sexual em touros bovinos. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n. 3, p. 11-28, 2015.
- MENEGASSI, S. R. O. et al. Effects of ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nelore bulls at the Brazilian Pantanal. **International journal of biometeorology**, v. 60, n. 11, p. 1787-1794, 2016.
- MENEGASSI, S. R. O. et al. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. **International journal of biometeorology**, v. 59, n. 3, p. 357-364, 2015.
- MORAES, J. C. F.; HORN, M. M.; ROSADO JR., A. G. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 647-652, 1998.
- NAHM, F. S. Infrared thermography in pain medicine. **Korean J Pain**, v. 26, p. 219-22, 2013.
- NIENABER, J. A.; HAHN, G. L. Livestock production system management responses to thermal challenges. **Int. J. Biometeorol**, v. 52, p. 149-157, 2007.
- NOGUEIRA NETO, A. F. Aspectos da pecuária piauiense. **Sociedade de Medicina Veterinária do Piauí**. Teresina, 1980.
- NYLAND, G. T.; MATTOON, J. S. Small animal diagnostic ultrasound, 2. ed. WB Saunders, 2002, 461p.
- O'BRIEN, J. K. et al. Semen collection, characterisation and artificial insemination in the beluga (*Delphinapterus leucas*) using liquid-stored spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 7, p. 770-783, 2008.

- PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 703-708, 2002.
- PETERSON, K.; KAPPEN, M. A. P. M.; URSEM, P. J. F.; NÖTHLING, J. O.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Microscopy and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, p. 863-871, 2007.
- PINHO, R.; CAMILO, B.; LIMA, D.; VILLADIEGO, F.; VERGARA, J.; SHIOMI, H.; CARDOSO, R.; LOPES, P.; GUIMARÃES, S.; GUIMARÃES, J. The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. **Reprod. Domest. Anim.** 2018, 53, 393–400.
- PLATZ, S. W.; SEAGER, C. C. Collection and evaluation of canine semen. **Vet. Clin. North. Am.**, v. 7, n. 4, p. 765-773, 1977.
- POURCELOT, L. Applications cliniques de l'examen Doppler transcutane. **Velocimetrie Ultrasonore Doppler**, p. 213-240, 1974.
- PRESTON, ROY C.; SHAW, Adam. **Recommended ultrasound field safety classification for medical diagnostic devices**. National Physical Laboratory, 2001.
- QUEIROZ, V. L. D. et al. Sazonalidade na congelabilidade de sêmen bovino. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 18, n. 1, p. 39–47, 2015.
- RAHMAN, M. B. et al. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, p. 1246–1257, 2011.
- RENAUDEAU, D. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 707–728, 2012.
- ROBERTO, J. V. B.; SOUZA, B. B. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 2, n. 3, p. 73-84, 2014.
- RODRIGUES, M. P. et al. Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano. **Braz. J Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 52, n. 2, p. 134–140, 2015.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 91-101, 2007.

ROTH, Terri L. et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). **Biology of reproduction**, v. 58, n. 2, p. 475-482, 1998.

ROTH, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, n. 2, p. 238–244, 2008

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SALVADOR, D.F.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R. et al. Perfil andrológico de touros da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, p. 64-67, 2002.

SANTOS, S. A. et al. Desempenho de bezerros Pantaneiros, Nelore e cruzados criados no Pantanal, Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 54, n. 206-207, p. 501-508, 2005.

SARAIVA, K. L. A.; SILVA, A. K. S. E.; WANDERLEY, M. I.; ARAÚJO, A. A. A.; SOUZA, J. R. B.; PEIXOTO, C. A. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 454-462, 2009.

SCHMIDT, P. I. et al. Genetic analysis of female reproductive efficiency, scrotal circumference and growth traits in Nelore cattle. **Theriogenology**, v. 128, p. 47-53, 2019.

SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Lab. Anim. Sci.**, v.22, p.177-182, 1972.

SILVA, A. R. et al. Descrição De Danos Ultraestruturais Em Espermatozoides Caninos Congelados-Descongelados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009.

SILVA, A. R.; FONTENELE-NETO, J. D.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M.; CHINIRÉA, V. H.; LOPES, M. D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009a.

SILVA, G. D. A. et al. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. **ACSA**, v. 1, p. 7–14, 2005.

SILVA, K. M. G. et al. Effect of trolox and pentoxifylline on motility and integrity of, acrossome and DNA of equine spermatozoa after thawing. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 42-49, 2009.

SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: FAPESP, 2000.

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. Nobel. São Paulo, 2000. 286 p.

- SOUZA, B. B.; BATISTA, N. L. Os efeitos do estresse térmico sobre a fisiologia animal. **ACSA**, v. 8, n. 3, p. 6–10, 2012.
- STRINA, A. et al. Annual variations in resistive index (RI) of testicular artery, volume measurements and testosterone levels in bucks. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 409-413, 2016.
- TAKAHASHI, L. S. et al. *Bioclimatologia Zootécnica*. p. 91, 2009.
- TEIXEIRA, H. C. A. et al. Seasonal influence on semen traits and freezability from locally adapted Curraleiro bulls. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 125, n. 1–4, p. 56–61, 2011
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A. PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessement of the acrossosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lecitin/hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299-309, 1997.
- VELASCO, Ana; RUIZ, Salvador. New Approaches to Assess Fertility in Domestic Animals: Relationship between Arterial Blood Flow to the Testicles and Seminal Quality. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 12, 2021.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VIANNA, E. et al. Estresse por calor: alterações na fisiologia reprodutiva e estratégias para amenizar seus efeitos negativos na fertilidade de fêmeas bovinas. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 16, n. 1, p. 79–85, 2013.
- VIANNA, F. P. et al. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Animal reproduction science**, v. 113, n. 1-4, p. 279-282, 2009.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 481- 492, 2000.
- WILTBANK, J. N., PARISH, N. R. Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected for semen quality. **Theriogenology**, v. 25, p. 779-783, 1986.
- WINTERS, Stephen J. Inhibin is released together with testosterone by the human testis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 70, n. 2, p. 548-550, 1990.
- ZAIDI, J. et al. Circadian variation in uterine artery blood flow indices during the follicular phase of the menstrual cycle. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The**

Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, v. 5, n. 6, p. 406-410, 1995.