

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA
NOS TRÓPICOS

JULIANI DE CÁSSIA TREVISAN DAL BEM

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SEMINAIS DE TOUROS DAS RAÇAS
BRAFORÐ E NELORE CRIADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE-GO**

ARAGUAÍNA - TO

2017

JULIANI DE CÁSSIA TREVISAN DAL BEM

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SEMINAIS DE TOUROS DAS RAÇAS
BRAFORD E NELORE CRIADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE-GO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Márcio Gianordoli
Teixeira Gomes

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Silvio Renato
Oliveira Menegassi

Co-orientadora: Prof^o. Dr^a. Deborah Alves
Ferreira

ARAGUAÍNA - TO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

D137a Dal Bem, Juliani de Cássia Trevisan.
Avaliação de parâmetros seminais de touros das raças Braford e Nelore criados no município de Rio Verde - GO. / Juliani de Cássia Trevisan Dal Bem. – Araguaína, TO, 2018.
73 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós- Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2018.

Orientador: Márcio Gianordoli Teixeira Gomes Coorientador: Silvio Renato Oliveira Menegassi

1. Adaptação. 2. Sêmen. 3. Testes funcionais. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JULIANI DE CÁSSIA TREVISAN DAL BEM

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SEMINAIS DE TOUROS DA RAÇA BRAFORD E
NELORE CRIADOS NO MUNICÍPIO DE RIO VERDE-GO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Márcio Gianordoli
Teixeira Gomes

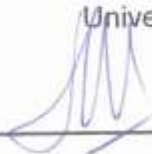
Aprovada em: 11/12/2017

BANCA EXAMINADORA



Prof^o. Dr^o. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes (Orientador)

Universidade Federal do Tocantins



Prof^o. Dr^o. Silvio Renato Oliveira Menegassi (Co-orientador)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof^o. Dr^o. Jorge Luis Ferreira (Membro interno)

Universidade Federal do Tocantins



Prof^o. Dr. Leandro Rodello (Membro externo)

Universidade Federal do Tocantins

Dedico esse trabalho aos meus pais, Jairo Trevisan Dal Bem e Eliana Matos Seguro, meu irmão, Julio Trevisan Dal Bem, e ao meu marido, Cezar Pitanga Gonçalves da Silva Neto, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jairo e Eliana, por tudo o que já fizeram por mim e me ensinaram. Seus valores me fizeram ser quem sou hoje e espero conseguir retribuir fazendo com que sempre se orgulhem de sua filha.

Ao meu marido, Cezar, que sempre acreditou em mim e certamente foi meu maior incentivador nesse mestrado. Todas as dificuldades que passamos valeram a pena, nos transformaram em pessoas melhores e hoje já estamos colhendo bons frutos. Grande parte do meu crescimento pessoal e profissional eu devo a você, agradeço a Deus por te ter do meu lado!!!

Ao meu irmão Julio e minha cunhada Suelen, por darem um grande presente para toda a família que foi a Alice, vocês são muito importantes para todos nós. Julio obrigada por toda a ajuda sempre.

Ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Márcio Gianordoli, por me acolher e confiar em mim, pode ter certeza que levarei seus ensinamentos para o resto da vida. Sou muito grata e tenho orgulho de ter sido sua orientada.

Ao meu co-orientador Prof^o. Dr^o. Silvio Menegassi, pelos ensinamentos e correções visando a melhoria do trabalho.

Aos pesquisadores Dr^o. Gabriel Pereira e Dr^o. Celso Koetz Junior, pela ajuda e paciência que tiveram comigo nas coletas.

Ao Sr. Fernando Fonseca e sua família, por abrir as portas de sua fazenda para a realização desse estudo, e por nos receberem extremamente bem em Rio Verde. Foi um prazer imenso ter conhecido toda a família, obrigada por tudo.

Aos graduandos de medicina veterinária Pedro Fumagalli e Juliana Anacleto, pela ajuda com as lâminas, acredito muito em vocês, sei que serão grandes profissionais.

A todos os professores do PPGSaspt, vocês são cruciais para nosso crescimento e amadurecimento profissional.

Às colegas e amigas que o mestrado me deu, Leidiane Lopes (*in memoriam*), Gabriela Carneiro e Rita Noronha, pelos bons momentos que passamos, sempre levarei vocês comigo.

Às técnicas do Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, Liana e Gilzelle, por toda a ajuda e disponibilidade, e ao Profº. Dr. Sandro Estevan Moron, por ter nos cedido o espaço e equipamentos do laboratório para a realização das análises. Muito obrigada.

RESUMO

Diante da necessidade de se produzir mais carne e de melhor qualidade, as raças sintéticas como o Braford têm ganhado espaço na pecuária nacional. O estresse por calor intenso é uma das principais causas da diminuição no desempenho reprodutivo de touros criados em clima tropical, por isso a adaptação dos touros a esse clima é indispensável para garantir sua fertilidade. Para determinar o padrão de apresentação de características físicas e funcionais do sêmen de touros Braford e Nelore criados em região de clima tropical, foram utilizadas amostras de sêmen de 15 touros da raça Braford e de 8 touros da raça Nelore, todos criados extensivamente. Foram realizadas 3 coletas de sêmen, com intervalo de 2 meses entre cada coleta e foram realizados testes convencionais: volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática; e também testes funcionais: avaliação da integridade da membrana plasmática (EOS-NIG), avaliação da integridade da membrana acrossomal (POPE) e avaliação da atividade citoquímica mitocondrial (DAB). Obteve-se a média do índice de temperatura e umidade (ITU) do período de 30 dias antes de cada coleta. Não houve diferença significativa entre as raças em relação à integridade de membrana plasmática, a média de espermatozoides dos touros Braford com membrana plasmática íntegra foi de 52,01% enquanto a dos touros Nelore foi de 36,49%. Em relação à integridade de membrana acrossomal também não houve diferença significativa entre os dois grupos genéticos, a média encontrada para touros Braford foi de 98,37% e para os touros Nelore foi de 99,24%. Não houve diferença significativa entre as raças em relação a atividade citoquímica mitocondrial, em ambas houve maior prevalência de espermatozoides classe II, sendo que a média encontrada para os touros Braford foi de 87,45% de espermatozoides classe II, e para os touros Nelore foi de 93,02%. Touros da raça Nelore apresentaram boa qualidade seminal em todas as coletas, enquanto touros da raça Braford apresentaram decréscimo ao final da estação de monta.

Palavras-chave: adaptação; sêmen; testes funcionais.

ABSTRACT

Faced to the need to produce more meat and with better quality, synthetic breeds such as Braford have gained space in the national livestock. The intense heat stress is the main cause of the decrease in the reproductive performance of bulls raised in tropical climate, so the adaptation of the bulls to this climate is indispensable to guarantee its fertility. In order to determine the of physical and functional characteristics of semen from Braford and Nelore bulls raised in tropical region, semen samples were used of 15 Braford bulls and 8 Nelore bulls, all of them extensively raised. Three collections of semen were performed, with a 2-month interval between each collection, and conventional tests were performed: volume, appearance, swirling, progressive motility, vigor, concentration and sperm morphology; and functional tests: evaluation of plasma membrane integrity (EOS-NIG), evaluation of the integrity of the acrosomal membrane (POPE) and evaluation of mitochondrial cytochemical activity (DAB). The mean temperature and humidity index (TUI) of the period of 30 days before each collection was obtained. There was no significant difference between the races in plasma membrane integrity, the mean spermatozoa of Braford bulls with whole plasma membrane was 52.01% while that of Nelore bulls was 36.49%. In relation to the integrity of the acrosomal membrane there was also no significant difference between the two genetic groups, the average found for Braford bulls was 98.37% and for Nelore bulls was 99.24%. There was no significant difference between the breeds in relation to the mitochondrial cytochemical activity, in both cases there was a higher prevalence of class II spermatozoa, and the average found for Braford bulls was 87.45% of class II spermatozoa, and for Nelore bulls of 93.02%. Nelore bulls showed good seminal quality in all piglets, while Braford bulls showed a decrease at the end of the breeding season.

Keywords: adaptation; semen; functional tests.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 A RAÇA BRAFORD | 14 |
| 2.2 A RAÇA NELORE | 15 |
| 2.3 PLASMA SEMINAL | 16 |
| 2.4 ESPERMATOZÓIDES | 18 |
| 2.5 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA | 20 |
| 2.6 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA | 20 |
| 2.7 TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR..... | 21 |
| 2.8 INFLUÊNCIA DO CLIMA TROPICAL EM ANIMAIS <i>Bos taurus</i> E <i>Bos indicus</i> | 23 |
| 2.9 ESTRESSE OXIDATIVO | 24 |
| 2.9.1 Espécies reativas de oxigênio X Fertilidade dos machos | 25 |
| 3. AVALIAÇÃO SEMINAL | 26 |
| 3.1 TESTES CONVENCIONAIS | 26 |
| 3.1.1 Volume do ejaculado | 27 |
| 3.1.2 pH | 27 |
| 3.1.3 Aspecto | 27 |
| 3.1.4 Turbilhonamento | 28 |
| 3.1.5 Motilidade | 28 |
| 3.1.6 Vigor | 29 |
| 3.1.7 Concentração espermática | 29 |
| 3.1.8 Morfologia espermática | 29 |
| 3.2 TESTES FUNCIONAIS | 30 |
| 3.2.1 Integridade da membrana plasmática | 30 |
| 3.2.2 Integridade da membrana acrossomal | 31 |
| 3.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial | 31 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. CONCLUSÃO | 32 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| CAPITULO II | 47 |
| ASPECTOS QUALI-QUANTITATIVOS DO SÊMEN DE TOUROS DAS RAÇAS BRAFord E NELORE CRIADOS EM REGIÃO DE CLIMA TROPICAL | 48 |
| RESUMO | 49 |
| ABSTRACT | 50 |
| 1. INTRODUÇÃO | 51 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 2.1 ANIMAIS | 52 |
| 2.2 LOCAL | 52 |
| 2.3 COLETA | 53 |
| 2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL..... | 53 |
| 2.4.1 Testes convencionais | 53 |
| 2.4.1.1 Volume, turbilhonamento, vigor e motilidade progressiva | 53 |
| 2.4.1.2 Concentração espermática | 54 |
| 2.4.1.3 Morfologia espermática | 54 |
| 2.4.2 Testes funcionais | 54 |
| 2.4.2.1 Integridade da membrana plasmática..... | 55 |
| 2.4.2.2 Integridade da membrana acrossomal | 55 |
| 2.4.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial..... | 55 |
| 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 56 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 4. CONCLUSÃO | 67 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da pecuária de corte possui uma grande representatividade no cenário econômico do país, em 2015 ela movimentou mais de R\$ 483,5 bilhões de reais, representando 30% do PIB do agronegócio brasileiro (ABIEC, 2016a). No mesmo ano o rebanho nacional ultrapassou os 215 milhões de cabeças de gado, com um crescimento de 1,3% em relação ao ano anterior (IBGE, 2015). Em 2016 as exportações de carne bovina chegaram a 1,4 milhões de toneladas, gerando uma receita de US\$ 5,5 bilhões de dólares (ABIEC, 2016b).

Diante da grande demanda mundial por carne bovina, surge a necessidade de tornar os sistemas de produção cada vez mais eficientes, aumentando, dessa forma, a produtividade do rebanho. Diversas variáveis são determinantes para o sucesso da produção, sendo a reprodução a primordial. Uma baixa eficiência reprodutiva resulta em um menor número de bezerros nascidos e, conseqüentemente, gera grandes perdas econômicas para a propriedade.

O rebanho brasileiro é composto, predominantemente, por animais de origem zebuína (*Bos taurus indicus*), principalmente da raça Nelore, reconhecida pela sua adaptação às condições tropicais brasileiras e pela rusticidade. Devido a necessidade de se produzir mais carne e de melhor qualidade, com atributos sensoriais como maciez, sabor e suculência, a utilização de raças taurinas (*Bos taurus taurus*) têm crescido significativamente. Porém esses animais são pouco adaptados ao clima tropical, o que pode acarretar quadros de subfertilidade (GABALDI; WOLF, 2002).

Com o objetivo de unir características como a rusticidade e adaptabilidade do gado *Bos taurus indicus*, com a produtividade e precocidade dos animais *Bos taurus taurus*, surgiram as raças compostas, como o Braford entre tantas outras. Espera-se da raça Braford a habilidade materna, docilidade e precocidade da raça Hereford, com a resistência aos parasitas, adaptação ao ambiente tropical e rusticidade da raça Nelore (ABHB, 2016).

A adaptação dos touros ao clima tropical é fundamental para garantir sua fertilidade, uma vez que o aumento da temperatura testicular pode resultar em um aumento no número de espermatozoides com defeitos morfológicos e na diminuição

da concentração e motilidade espermática (GABALDI; WOLF, 2002). Os espermatozoides anormais, assim como os infiltrados leucocitários, são uma grande fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O desequilíbrio entre a produção de ROS e a quantidade de antioxidantes disponíveis leva ao estresse oxidativo e a danos ao DNA, por exemplo (KOTHARI et al., 2010).

Existem diversos testes convencionais e funcionais que visam identificar a composição estrutural e funcional do espermatozoide (RODRIGUES, 2009). Os testes convencionais determinam o volume do ejaculado, pH, aspecto, turbilhonamento, vigor, motilidade, concentração e a morfologia espermática (CBRA, 2013). Já os testes funcionais são mais específicos e analisam, por exemplo, a integridade da membrana plasmática, integridade da membrana acrossomal e a atividade citotóxica mitocondrial.

Em um cenário com uma alta competitividade e pequenas margens de lucro como o da pecuária, é indispensável que as perdas no processo de produção sejam mínimas, por isso a escolha dos animais destinados à reprodução deve ser criteriosa. Os testes convencionais juntamente com os funcionais, proporcionam a identificação dos animais com infertilidade ou subfertilidade, e suas causas, e também permite a identificação dos animais férteis e, conseqüentemente, mais adaptados às condições climáticas.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi de determinar o padrão de apresentação das características físicas e funcionais do sêmen de touros da raça Braford criados em região de clima tropical com a variação climática das estações encontradas de quente e seca e quente e úmida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A RAÇA BRAFORD

O Braford surgiu na Flórida em 1947, quando Alto Adams Jr. iniciou um programa de cruzamento utilizando vacas da raça Brahman e touros da raça Hereford,

que gerou bezerros excepcionais; porém observou-se que os touros Hereford puros apresentavam graves problemas nos olhos e nas patas, e que não eram adaptados à região em que se pretendia criá-los (ABC, _). A partir daí Adams começou a experimentar touros com vários graus de sangue Brahman-Hereford e identificou touros que estavam produzindo bezerros que atendiam à sua necessidade, e dessa forma utilizou esses touros e sua progênie para formar o “Rebanho da Fundação da raça Braford” nos Estados Unidos (ABC, _).

Já no Brasil, em 1967, o criador Rubem Silveira Vasconcellos iniciou a importação de animais da raça Brahman com a intenção de cruzá-los com bovinos da raça Hereford (ABHB, _). A partir da década de 80 a Associação Brasileira de Criadores de Hereford e Braford, com apoio da Embrapa Pecuária Sul, começou a orientar e oficializar esse processo de criação (ABHB, _). Em 1993 a Associação Brasileira de Criadores de Hereford e Braford obteve o reconhecimento de raça em formação pelo Ministério da Agricultura, e, somente em 2003, o Braford foi reconhecido como raça no Brasil (ABC, _; ABHB, _).

O grau de sangue da raça Braford original é composto por 3/8 de sangue Brahman e 5/8 de sangue Hereford, já no Braford brasileiro se utiliza a raça Nelore ao invés do Brahman, originando animais com 3/8 de sangue Nelore e 5/8 de sangue Hereford (ABC, _). São animais que apresentam características da raça Hereford como precocidade sexual e na terminação, habilidade materna e carne de melhor qualidade; e também características da raça Nelore como rusticidade, resistência à ectoparasitas, adaptação aos trópicos e alto rendimento de carcaça (ABHB, _).

Segundo o último relatório de comercialização de sêmen divulgado pela Associação Brasileira de Inseminação Artificial - ASBIA em 2011, foram comercializadas 70.487 doses de sêmen de touros Braford em 2009, 85.189 doses em 2010 e 120.211 doses em 2011 (ASBIA, 2011).

2.2 A RAÇA NELORE

A raça Ongole, ou Nelore, como é conhecida no Brasil, surgiu mil anos antes da era cristã (ACNB, _). Nelore é o nome de um distrito da antiga Província de Madras,

Estado de Andra na Índia, de onde foram embarcados os primeiros animais com destino ao Brasil na primeira metade do século XIX (ACNB, _). As duas últimas importações significativas de reprodutores Nelore ocorreram entre os anos de 1960 e 1962, em que desembarcaram no país grandes genearcas como Golias, Kavardi, Rastã, Checurupadu, Godhavari, Padu e Akasamu, que são as bases das principais linhagens de Nelore no Brasil (ACNB, _).

Os animais da raça Nelore são reconhecidos por sua adaptação às condições tropicais brasileiras, com alta resistência ao calor e à parasitas, devido às suas características corporais (ACNB, _). São animais que apresentam excelentes rendimentos de carcaça, por apresentarem ossatura fina, leve e porosa, e menor proporção de cabeça, patas e vísceras (ACNB, _).

Segundo estimativas, a raça Nelore é responsável por 80% da força produtiva da indústria da carne no país (RURAL CENTRO, _). Diante de sua grande representatividade, surgem programas que buscam a padronização e qualidade da carne produzida por esses animais, como o Programa de Qualidade Nelore Natural – PQNN, que visa valorizar e divulgar a raça, posicionando a marca Nelore como a principal marca de carne do Brasil (COMPRERURAL, 2017).

De acordo com o relatório de comercialização de sêmen da ASBIA, em 2011 foram comercializadas mais de três milhões de doses de sêmen da raça Nelore no Brasil, representando 40,04% do total negociado no período (ASBIA, 2011).

2.3 PLASMA SEMINAL

O sêmen é uma suspensão celular líquida composta por espermatozóides e secreções das glândulas sexuais acessórias do macho, sendo a porção fluida chamada de plasma seminal (MIES FILHO & BARRETO, 1949). O plasma seminal é o resultado de secreções provenientes das glândulas sexuais acessórias, dos epidídimos, ductos deferentes e do epitélio seminífero, sendo composto por proteínas, enzimas, hormônios, ácidos graxos, aminoácidos, peptídeos, lipídeos, íons, sorbitol, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ergotioneína, glicerilfosforilcolina e frutose

(CHACUR; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006; GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012; HAFEZ, B.; HAFEZ, E., 2004).

Essa porção do sêmen apresenta várias funções: controla a osmolaridade; age como diluente e veículo para os espermatozóides ejaculados; fornece energia aos espermatozóides; atua como agente antioxidante de compostos bioquímicos; estimula a motilidade espermática; e apresenta efeito bactericida e imuno-modulatório (RODRIGUES, 2009; CHACUR; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006). Algumas proteínas presentes no plasma seminal, conhecidas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30-kDa, ou simplesmente proteínas BSP, se ligam ao espermatozóide no momento da ejaculação e participam do processo de capacitação espermática (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1998).

Os ácidos graxos presentes no plasma seminal atuam na atividade funcional dos espermatozóides, na proteção celular ao choque térmico e na manutenção da motilidade espermática, sendo eles os ácidos: palmítico, oléico, docosahexaenóico (DHA), linoléico, linolênico, esteárico e araquidônico (GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012; KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI; FARZADI, 2008; TAVILANI et al., 2008).

Por outro lado, os ácidos graxos tornam o sêmen mais susceptível ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), que são agentes altamente reativos e dentre eles estão os radicais livres (ALMEIDA, 2006). As principais fontes de ROS no ejaculado são os espermatozóides, morfológica ou funcionalmente anormais (espermatozóides imóveis e morfológicamente anormais geram maiores quantidades de ROS), e os leucócitos, que podem estar presentes (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; MAIA; BICUDO, 2009).

As ROS reagem com os ácidos graxos insaturados, desencadeando uma cascata de peroxidação lipídica, que diminui a fluidez e integridade da membrana espermática, geralmente esse estresse oxidativo ocorre quando os antioxidantes presentes no ejaculado não conseguem eliminar o excesso de ROS (MAIA; BICUDO, 2009; STOREY, 1997). Porém quando as ROS são produzidas de forma controlada e em pequenas quantidades estimulam o processo de capacitação espermática através da elevação do AMPc, ativação da proteína Quinase A e da indução da fosforilação da tirosina (SARASWAT; KHARCHE; JINDAL, 2014).

Para neutralizar os efeitos dos radicais livres o plasma seminal e os próprios espermatozóides apresentam antioxidantes não-enzimáticos como o ascorbato (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), a glutathione (GSH), taurina, hipotaurina, urato e piruvato, e também os antioxidantes enzimáticos, sendo a catalase, a superóxido dismutase (SOD) e o sistema glutathione peroxidase / redutase (GPx / GRD) as principais enzimas responsáveis por esse processo (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; ALMEIDA, 2006; RODRIGUES, 2009; SILVA; GUERRA, 2011). Tanto os antioxidantes enzimáticos como os não-enzimáticos podem atuar tanto removendo o excesso de ROS antes que lesione o espermatozóide, quanto reparando as lesões já causadas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Analisando o sêmen fresco de bovinos, Bilodeau et al. (2000) observaram que no espermatozóide a atividade da glutathione peroxidase era baixa e não detectaram nenhuma atividade da catalase, enquanto no plasma seminal havia uma grande atividade da glutathione peroxidase e uma pequena atividade da catalase; já a superóxido dismutase apresentou alta atividade tanto no espermatozóide quanto no plasma seminal, e que o nível de glutathione no espermatozóide era alto e no plasma seminal era muito baixo; dessa forma ficou demonstrado que a superóxido dismutase e a glutathione são os principais antioxidantes intracelulares no espermatozóide dessa espécie, e que a atividade da glutathione peroxidase e da catalase detectada é atribuída ao plasma seminal.

2.4 ESPERMATOZÓIDES

Os espermatozóides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos, através de um processo chamado espermatogênese, em que há a divisão e transformação das células tronco germinativas (GARNER; HAFEZ, 2004). A composição química do espermatozóide é baseada principalmente em ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos; e os constituintes inorgânicos são, basicamente, o fósforo, nitrogênio e enxofre (GARNER; HAFEZ, 2004).

São células haplóides, alongadas, com três regiões altamente especializadas envolvidas por uma membrana plasmática: cabeça, que contém o núcleo com o

genoma masculino; a peça intermediária, que apresenta mitocôndrias e está envolvida na produção de energia; e o flagelo ou cauda, responsável pela motilidade (FLESCHE; GADELLA, 2000; GARNER; HAFEZ, 2004; TANNO, 2009).

A membrana plasmática dos espermatozoides envolve toda a célula e, devido a sua característica semipermeável, mantém um gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis (ALMEIDA, 2006). É composta por uma bicamada de lipídeos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, com destaque para o ácido docosahexaenóico (DHA), que conferem à membrana as características de permeabilidade e fluidez (FLESCHE; GADELLA, 2000; TAVILANI, 2008).

A principal característica da cabeça do espermatozoide é a presença de um núcleo achatado de forma oval, contendo uma cromatina altamente condensada, sendo essa composta por ácido desoxirribonucleico (DNA) que forma um complexo com proteínas básicas chamadas de protaminas espermáticas (GARNER; HAFEZ, 2004). Entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça encontra-se o acrossomo ou capa acrossomal, que é uma estrutura semelhante a uma vesícula e contém enzimas hidrolíticas, como a acrosina e hialuronidase, essenciais para a interação entre o espermatozoide e o oócito (FLESCHE; GADELLA, 2000; GARNER; HAFEZ, 2004).

Posteriormente encontra-se o colo ou peça de conexão, sendo o responsável por ligar a cabeça do espermatozoide à peça intermediária (TANNO, 2009). A porção central da peça intermediária, juntamente com o comprimento total da cauda, origina o axonema, que é composto por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais e é responsável pela motilidade espermática (RODRIGUES, 2009). Na peça intermediária, o axonema está circundado por nove fibras densas, e ambos são recobertos por uma bainha mitocondrial, que geram a energia necessária para a motilidade espermática (GARNER; HAFEZ, 2004).

Por fim o flagelo, que é subdividido em peça principal e peça terminal (FLESCHE; GADELLA, 2000). A peça principal é composta pelo axonema associado às fibras densas, e uma camada fibrosa que fornece estabilidade aos elementos contráteis da cauda; enquanto isso a peça terminal apresenta apenas o axonema recoberto pela membrana plasmática (GARNER; HAFEZ, 2004).

2.5 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

Após sua formação o espermatozóide ainda precisa passar por um processo de maturação para que consiga fertilizar o oócito, essa maturação se inicia na cabeça do epidídimo e segue pelo corpo até a cauda proximal do epidídimo (OLIVA; RINALDO; STUMPP, 2009). Cada região do epidídimo correlaciona características morfológicas com propriedades funcionais, sendo que a cabeça e o corpo do epidídimo estão relacionados com a aquisição de habilidade progressiva dos espermatozoides e capacidade fecundante, enquanto na cauda é onde ocorre o armazenamento espermático e a remoção de células anormais (PINHO et al., 2015).

Durante o trânsito epididimário os espermatozoides são expostos à fluídos que vão sofrendo alterações de osmolaridade, de proporção iônica, de tipos proteicos e das reservas energéticas; já as modificações funcionais dos espermatozoides envolvem a maturação de organelas celulares (GARNER; HAFEZ, 2004; OLIVA; RINALDO; STUMPP, 2009; PINHO et al., 2015).

O desenvolvimento da capacidade de motilidade progressiva dos espermatozoides reflete em modificações qualitativas e quantitativas nos padrões metabólicos do aparelho flagelar, o que resulta em alterações na flexibilidade e nos padrões de movimentos dos flagelos (GARNER; HAFEZ, 2004).

Glicoproteínas presentes no fluido epididimário, como a carnitina, ácido siálico e acetilfosforil colina, se ligam a membrana do espermatozóide, formando uma capa protetora, e também estão associadas as principais alterações sofridas pelos espermatozoides durante a passagem pelo epidídimo, que são elas: capacidade de se mover; capacidade de reconhecer e se ligar à zona pelúcida do oócito; formação da matriz acrossomal e perda da gota citoplasmática do espermatozóide (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003; OLIVA; RINALDO; STUMPP, 2009).

2.6 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Após a maturação no epidídimo, os espermatozóides apresentam movimentação ativa, porém não possuem a capacidade de fertilizar o oócito logo após a ejaculação (SOUSA, 2003). Essa habilidade só é adquirida no trato reprodutivo da fêmea, onde ocorre mudanças fisiológicas que tornam os espermatozóides capazes de fertilizar o oócito (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Durante o processo de capacitação ocorre alteração na estrutura e composição da membrana dos espermatozóides, como um efluxo de colesterol da superfície espermática e redução da proporção entre colesterol e fosfolípido na membrana (EHRENWALD; FOOTE; PARKS, 1990; HAFEZ, B.; HAFEZ, E., 2004). A partir dessa desestabilização da bicamada fosfolipídica ocorrerá a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, iniciando a reação acrossômica (BAZER; GEISERT; ZAVY, 1995). Há também a retirada de componentes que recobrem a cauda do espermatozóide, resultando em hiperativação espermática, que são mudanças no padrão do batimento flagelar que facilitam a penetração do espermatozóide no oócito (OLIVEIRA, 2007).

A capa de glicoproteína, que foi formada durante a maturação espermática, é removida ou alterada nesse momento, para expor sítios de receptores presentes na membrana do espermatozóide e remover componentes que estejam recobrendo a cauda, o que pode restringir a motilidade hiperativa flagelar (OLIVEIRA, 2007).

Nos ruminantes, em que a deposição do sêmen ocorre na vagina, o processo de capacitação tem início durante a passagem do sêmen pela cérvix (SOUSA, 2003). O atrito entre a superfície espermática e o muco cervical adsorve substâncias como as proteínas do plasma seminal, o que facilita a capacitação (SOUSA, 2003). Em seguida os espermatozóides são armazenados em segmentos anteriores ao istmo, aderindo-se ao epitélio, capacitando-se lentamente (SOUSA, 2003).

2.7 TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR

A termorregulação testicular é o processo que visa a manutenção da temperatura testicular, que deve permanecer de 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal para que não ocorra um efeito deletério na espermatogênese (BARROS et

al., 2011; KOIVISTO et al., 2009; KASTELIC; COOK; COULTER, 1997). Esse controle ocorre por mecanismos locais, como: troca de calor contracorrente, regulação do fluxo sanguíneo, posição dos testículos e sudorese (KASTELIC; COOK; COULTER, 1997).

O mecanismo de troca de calor contracorrente e a regulação do fluxo sanguíneo ocorrem no cone vascular, formado pelas veias do plexo pampiniforme e pela artéria testicular, em que a artéria testicular, que é altamente espiralada e longa, encontra-se envolvida pela veia testicular, havendo transferência de calor do sangue arterial para o venoso e também a regulação do fluxo sanguíneo que chega ao testículo (BARROS et al., 2011; GABALDI; WOLF, 2002). Esse mecanismo permite tanto que o sangue arterial seja resfriado antes de chegar aos testículos, como que o sangue venoso seja aquecido até uma temperatura próxima à corporal antes de penetrar na cavidade abdominal (SETCHELL, 2006).

O escroto penduloso também favorece a troca de calor, pois distancia os testículos do corpo do animal e aumenta a área de superfície que ajuda a expor o cone vascular ao meio ambiente (GABALDI; WOLF, 2002). Além disso, a pele do saco escrotal é fina, com pouca deposição de gordura subcutânea, e possui pelos delgados e curtos, o que facilita a perda de calor por irradiação (TANIGUTI; BIRCK, _).

A pele escrotal também apresenta grande número de glândulas sudoríparas, que produzem cerca de 77,5 g/m²h de suor, enquanto as glândulas da região torácica produzem cerca de 69,1 g/m²h de suor, favorecendo a perda de calor (RODRIGUES, 2009; GABALDI; WOLF, 2002; TANIGUTI; BIRCK, _).

Por fim, observa-se a ação do músculo Cremáster e da túnica Dartos, que auxiliam no processo de termorregulação testicular devido ao posicionamento dos testículos e à espessura do saco escrotal, respectivamente (FERRAZ et al., 2016). Quando a temperatura ambiente está elevada, o músculo Cremáster se encontra totalmente relaxado, afastando os testículos da parede abdominal e aumentando a superfície de contato entre o testículo e o escroto, já quando a temperatura ambiente está baixa, o Cremáster se contrai, aproximando as gônadas do abdômen (RODRIGUES, 2009; GABALDI; WOLF, 2002).

2.8 INFLUÊNCIA DO CLIMA TROPICAL EM ANIMAIS *Bos taurus* E *Bos indicus*

Cerca de dois terços do território brasileiro está situado na região dos trópicos, que apresenta elevadas temperaturas e umidade relativa do ar como características marcantes, que favorece a ocorrência de alterações dos parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais, que é o denominado estresse térmico ou estresse por calor (AZEVEDO et al., 2005; MACEDO et al., 2013; OLIVEIRA; TIBURCIO; FERREIRA, 2012). O estresse térmico é causado pela associação entre elevadas temperaturas ambientais e umidade relativa do ar, radiação e velocidade dos ventos (PEREIRA et al., 2017).

O estresse por calor prolongado leva a uma sobrecarga nos mecanismos fisiológicos de perda de calor, podendo resultar em um quadro de degeneração testicular (HORN; MORAES; MACIEL, 2002). Acredita-se que a degeneração testicular é uma das principais causas de subfertilidade e infertilidade de touros, que na maioria dos casos é um quadro reversível, e pode ser caracterizada por diminuição da concentração espermática e aumento da porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos (GABALDI; WOLF, 2002; HORN; MORAES; MACIEL, 2002). Além disso, o estresse pelo calor também pode inibir o instinto sexual dos touros e até mesmo levar a suspensão total da libido (TAKAHASHI; BILLER; TAKAHASHI, 2009).

Dessa forma, os bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*), que foram desenvolvidos em regiões de clima tropical, adquiriram genes (por mutação ou herança genética) que determinam maior tolerância ao calor (MACEDO et al., 2013). Além disso, nesses animais o escroto e a subtúnica testicular facilitam a troca de calor, ao contrário dos animais europeus em que o gradiente de temperatura é negativo (RODRIGUES, 2009). Essa superioridade na habilidade termorregulatória tornou esses animais mais adaptados a climas quentes quando comparados à animais de raças europeias (*Bos taurus taurus*), ou seja, quando expostos à elevadas temperaturas o gado zebuíno apresenta menos efeitos deletérios do que o gado europeu, fator determinante para um bom desempenho reprodutivo (HANSEN, 2009; MACEDO et al., 2013).

O estresse térmico não afeta apenas o testículo, com o estresse há um aumento na concentração de cortisol circulante, que afeta negativamente a produção

de testosterona e, conseqüentemente, na espermatogênese (BARTH; BOWMAN, 1994).

2.9 ESTRESSE OXIDATIVO

O precursor do estresse oxidativo é o eventual desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), que pode ser ocasionado pelo aumento na produção de ROS e/ou pela diminuição de antioxidantes disponíveis (ROCHA, 2013). Dentre as ROS estão os radicais livres, que são moléculas, átomos ou íons que possuem um elétron desemparelhado, reativo e instável que, para se tornar estável, tende a se ligar a outro elétron (SOUZA; FERREIRA, 2007).

Substâncias químicas como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), são algumas espécies reativas de oxigênio, sendo que primeiramente são formados o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e posteriormente os demais, onde o radical hidroxila (OH^-) é a espécie mais reativa e prejudicial (HALLIWELL, 2006).

Pequenas quantidades de radicais livres são necessárias para que ocorram processos fisiológicos como a maturação e capacitação espermática, a indução da reação acrossomal, a estabilização das mitocôndrias na peça intermediária e a fusão do espermatozóide e oócito (KOTHARI et al., 2010). Em contrapartida os radicais livres podem induzir a lipoperoxidação de membrana, danos ao DNA e apoptose (KOTHARI et al., 2010). Dessa forma é necessário que haja equilíbrio entre a produção de ROS e a proteção de antioxidantes para assegurar a normalidade da função espermática (CASTELLINI et al., 2002).

A célula possui um sistema de defesa para se proteger dos efeitos das ROS, atuando tanto removendo os agentes antes de causarem lesões, como também reparando as lesões já ocorridas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os agentes antioxidantes responsáveis pela remoção de ROS são: glutathiona reduzida (GSH); glutathiona-peroxidase (GSH-Px); superóxido-dismutase (SOD); catalase; e vitamina E (α -tocoferol) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LEWIS et al., 1997; SILVA; GUERRA, 2011). Já os agentes responsáveis pela reparação das lesões ocorridas são: ácido

ascórbico (vitamina C); glutathiona-redutase (GSH-Rd); glutathiona-peroxidase (GSH-Px); entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SILVA; GUERRA, 2011).

Durante o processo de maturação espermática, a célula perde o citoplasma e, conseqüentemente, parte dos agentes antioxidantes (LEWIS et al., 1997). Dessa forma, a proteção do espermatozóide ocorrerá pelos agentes antioxidantes presentes no plasma seminal, como: ácido ascórbico (vitamina C); α -tocoferol (vitamina E); ácido úrico; catalase; superóxido dismutase; glutathiona; albumina; taurina; hipotaurina; entre outros (BORGES et al., 2011; LEWIS et al., 1997; SIKKA, 2004).

2.9.1 Espécies reativas de oxigênio X Fertilidade dos machos

Sabe-se que a maior produção de ROS se dá por infiltrados leucocitários e também por espermatozóides com defeitos morfológicos, dentre eles, principalmente os que possuem resíduos de citoplasma (gota citoplasmática), isso porque esses resíduos podem aumentar a capacidade da célula em produzir NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), que serve como fonte de elétrons para a produção de ROS (AITKEN; BARKER, 2002). Em um estudo realizado com sêmen bovino proveniente do epidídimo, os espermatozóides que possuíam gota citoplasmática proximal (defeito maior) apresentaram maior suscetibilidade ao estresse oxidativo do que os espermatozóides com gota citoplasmática distal (defeito menor) (RODRIGUES, 2009).

Os espermatozóides são muito suscetíveis aos danos oxidativos por dois motivos: primeiro porque durante o processo de maturação espermática os espermatozóides perdem grande parte dos agentes antioxidantes com a perda do citoplasma; e segundo porque sua membrana plasmática apresenta uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, que são os principais alvos das ROS por possuírem grandes quantidades de insaturações (duplas ligações) (AITKEN; FISHER, 1994).

Ao entrar em contato com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática, especialmente o DHA (ácido docosa-hexaenóico), as ROS retiram uma molécula de hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que

irá agir da mesma forma em outro ácido graxo poliinsaturado (RODRIGUES, 2009). Esse processo é chamado de peroxidação lipídica, e pode inativar hormônios e enzimas, levar a uma perda de fluidez, modificar estruturas proteicas, aumentar a permeabilidade celular, que acarreta na perda da integridade de membrana e ruptura da célula (RODRIGUES, 2011).

Portanto, o estresse oxidativo causado pelo excesso de ROS afeta a fluidez da membrana plasmática do espermatozóide, promove danos celulares que levam a apoptose das células germinativas resultando na queda da fertilidade (OLLERO et al., 2001; RODRIGUES, 2011).

3. AVALIAÇÃO SEMINAL

O objetivo da avaliação da qualidade seminal é determinar o potencial de fertilidade dos animais, possibilitando, por exemplo, a identificação de animais com maior fertilidade dentro de um rebanho avaliado (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993). A identificação da fertilidade dos reprodutores é essencial para a eficiência reprodutiva, uma vez que a utilização de reprodutores subférteis ou inférteis pode gerar consequências desastrosas para o rebanho, como uma baixa taxa de prenhez (ADDAD et al., 2009).

Nenhuma medida ou critério isolado é capaz de prever com confiabilidade a fertilidade do animal, portanto vários critérios devem ser avaliados para alcançar um diagnóstico acurado (KASTELIC; THUNDATHIL, 2008).

Existem vários métodos laboratoriais que permitem identificar aspectos pertinentes à composição estrutural e funcional da célula espermática, e, de acordo com a natureza e especificidade de cada teste, eles podem ser divididos em dois grupos: testes convencionais e testes funcionais (RODRIGUES, 2009).

3.1 TESTES CONVENCIONAIS

As técnicas clássicas de avaliação seminal consistem de várias análises descritivas que visam determinar o volume do ejaculado, pH, aspecto, movimento em massa (turbilhonamento), motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (CBRA, 2013).

A determinação do volume do ejaculado, pH, aspecto, turbilhonamento, motilidade e vigor, são exames imediatos, ou seja, são realizados imediatamente após a coleta da amostra; enquanto a determinação da concentração e morfologia espermática são exames mediatos, que são procedimentos realizados posteriormente a partir de amostras armazenadas (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015).

3.1.1 Volume do ejaculado

O volume é expresso em mililitros (mL) e pode sofrer algumas variações de acordo com: o método de coleta, sendo a coleta por vagina artificial a que proporciona volumes mais próximos dos fisiológicos; a raça; o regime de serviços antes da coleta; e o tempo de excitação (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). O volume do ejaculado de touros coletados pela vagina artificial varia de 5 a 8 mL (CBRA, 2013).

3.1.2 pH

O pH do sêmen deve ser próximo a neutralidade, variando de 6,0 a 7,0 em bovinos; quando o pH tende à acidez pode indicar processos infecciosos, e, em contrapartida, quando o pH tende à alcalinidade pode indicar que a amostra foi contaminada com urina (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015).

3.1.3 Aspecto

A avaliação do aspecto do sêmen é feita visualmente e esse aspecto varia de acordo com a concentração de espermatozóides, sendo classificado como: cremoso,

leitoso, seroso ou aquoso (CBRA, 2013). Nessa classificação o sêmen cremoso corresponde ao com maior concentração espermática e o sêmen aquoso ao de menor concentração espermática (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015).

3.1.4 Turbilhonamento

O turbilhonamento é o movimento em massa dos espermatozóides, sendo que a intensidade desse movimento é resultado da combinação entre motilidade, vigor e concentração espermática, ou seja, um movimento em massa intenso indica a presença de um grande número de espermatozóides viáveis (CBRA, 2013; MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). A classificação do turbilhonamento é feita em uma escala de zero a cinco, sendo zero a ausência de movimento em massa, e cinco um acentuado movimento em massa (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). O desejável para o ejaculado de bovinos é um turbilhonamento maior ou igual a 3 (CBRA, 2013).

3.1.5 Motilidade

A motilidade é definida pelo percentual de espermatozóides móveis e serve como um bom indicador da viabilidade dos espermatozóides contidos na amostra (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). É uma avaliação subjetiva, feita visualmente, mas que pode ser realizada por meio de análises computadorizadas (CBRA, 2013). Sistemas computadorizados e automatizados, como o CASA (Computer-assisted Sperm Analysis), permitem a análise objetiva da motilidade espermática (BERGSTEIN et al., 2014). É desejável que a motilidade espermática para o sêmen de bovinos seja maior ou igual a 60% (CBRA, 2013). Provavelmente, a energia necessária para a motilidade é derivada das reservas intracelulares de adenosina trifosfato (ATP), sendo que sua degradação é regulada pelo nível endógeno de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (RODRIGUES, 2009; TURNER, 2003).

3.1.6 Vigor

O vigor representa o movimento progressivo dos espermatozóides, sendo caracterizado pela velocidade com que essas células atravessam o campo ótico do microscópio (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). Pode ser classificado através de um escore que varia de zero a cinco, em que zero representa a ausência de movimento progressivo e cinco representa um movimento progressivo, vigoroso e veloz (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). No ejaculado de bovinos se espera um vigor maior ou igual a 3 (CBRA, 2013).

3.1.7 Concentração espermática

A avaliação da concentração determina o número de espermatozóides por mL de sêmen, permitindo, dessa forma, que seja determinado o número de fêmeas que poderão ser inseminadas com esse ejaculado (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015; RODRIGUES, 2009).

A concentração espermática pode ser determinada através de três métodos: espermiodensimetria; espectrofotometria; e contagem em câmara de Neubauer (hematocitômetro), sendo esse o método mais comum (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). A concentração espermática desejável para um ejaculado de bovinos é de aproximadamente 350×10^6 de espermatozóides por mL de sêmen (CBRA, 2013).

3.1.8 Morfologia espermática

A morfologia espermática apresenta uma grande correlação com a fertilidade do animal, ou seja, animais que apresentam ejaculados com elevados níveis de defeitos morfológicos nos espermatozóides, são animais menos férteis (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). A avaliação da morfologia pode ser realizada com o uso de esfregaços corados ou em lâminas com preparação úmida (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015).

As anormalidades da morfologia espermática podem ser classificadas em defeitos maiores e menores; primários ou secundários; de acordo com a região da célula em questão ou de acordo com algumas patologias específicas, como: defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de acrossoma, defeitos de cauda cabeças isoladas normais e gota citoplasmática proximal (CBRA, 2013; MENEGASSI; BARCELLOS, 2015).

É desejável que o touro apresente no mínimo 70% de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado, sendo aceito no máximo 10% de defeitos maiores totais, com até 5% de defeitos maiores individuais, e 20% de defeitos menores totais, com até 10% de defeitos menores individuais (CBRA, 2013).

3.2 TESTES FUNCIONAIS

Testes funcionais são utilizados para tentar prever com maior acurácia a qualidade do sêmen, avaliando, por exemplo, a integridade da membrana plasmática, integridade da membrana acrossomal e a atividade citoquímica mitocondrial (MELO; HENRY; BEKER, 2005; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2013).

3.2.1 Integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é de grande importância para o funcionamento do espermatozóide e para o processo de fertilização (SNOECK et al., 2014). Isto é, para que o espermatozóide sofra a capacitação, e, posteriormente, se ligue e penetre na zona pelúcida, é essencial que a membrana plasmática se encontre íntegra (JEYENDRAN et al., 1984).

Métodos de avaliação como o teste hiposmótico e a utilização de sondas fluorescentes são eficazes na identificação de células com membrana plasmática danificada, porém a técnica mais utilizada é a de coloração por eosina-nigrosina, por possuir alta habilidade em diferenciar células com membrana lesada e íntegra, e, também, por sua praticidade e baixo custo (JEYENDRAN et al., 1984; PINTADO; DE

LA FUENTE; ROLDAN, 2000; ZÚCCARI et al., 2009). Quando a membrana plasmática está danificada o corante consegue penetrar e corar o citoplasma da célula, sendo possível fazer a diferenciação entre as células com membrana íntegra e danificada (GONÇALVES et al., 2013).

A eosina é um corante supravital que só penetra em membranas plasmáticas lesadas e se liga aos ácidos nucléicos, conferindo uma coloração rosada; já a nigrosina é a responsável pelo contraste mais escuro de fundo da lâmina, facilitando a observação dos espermatozóides não corados (ARRUDA et al.; 2010; BRITO; 2007).

3.2.2 Integridade da membrana acrossomal

A integridade da membrana acrossomal é indispensável para que ocorra a fertilização, uma vez que no acrossomo estão contidas as enzimas acrossomais, que são liberadas durante a reação acrossômica, permitindo a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e sua fusão com a membrana plasmática do oócito (FLESCHE; GADELLA, 2000; RODRIGUES, 2009).

Para a avaliação da integridade da membrana acrossomal pode-se utilizar a microscopia eletrônica para observar possíveis alterações morfológicas, ou também pode-se realizar testes funcionais, com o uso de corantes ou de sondas fluorescentes (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

Dessa forma, Pope, Zhang e Dresser (1991) desenvolveram um método simples e rápido para corar essa organela, denominado coloração simples de Pope. Uma membrana acrossomal não íntegra é identificada pela porção anterior da cabeça do espermatozóide um pouco mais clara que a porção posterior (WISNIEWSKI, 2013).

3.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial

As mitocôndrias são responsáveis por produzir a adenosina trifosfato (ATP), que está diretamente relacionada com a motilidade do espermatozóide, que ocorre pela movimentação de sua cauda, o que gera um alto gasto energético, sendo a desfosforilação da ATP a principal fonte de energia consumida nesse processo (RODRIGUES, 2009). Dessa forma, alterações na atividade das mitocôndrias pode ser um fator relacionado à infertilidade (CARREIRA, 2008).

Podem ser utilizadas sondas fluorescentes para visualizar essas organelas, como a Rhodamina 123, MitoTracker Green, MitoTracker Red, MitoTracker Orange, MitoTracker Deep Red e JC-1 (CARREIRA, 2008; RODRIGUES, 2009). Entretanto, são descritos diversos problemas associados a essas técnicas, como baixa sensibilidade e interação com o diluidor (HALLAP, 2005).

Hrudka (1987) desenvolveu um método citoquímico que consiste na avaliação indireta da atividade da enzima Citocromo C, analisada sobre a oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Por meio de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nas mitocôndrias, que é onde ocorre a reação (RODRIGUES, 2009; WISNIEWSKI, 2013). Através da microscopia convencional é possível identificar essa deposição, pois fica com uma coloração marrom (RODRIGUES, 2009).

4. CONCLUSÃO

Ao avaliar o desempenho reprodutivo de touros deve-se atentar às variáveis climáticas, uma vez que exercem influência direta sobre os mecanismos fisiológicos e comportamentais de perda de calor desses animais, o que, por sua vez, pode resultar em uma queda na produção de sêmen ou na qualidade seminal.

Devido a origem das raças, existem aquelas que são mais adaptadas às condições climáticas brasileiras, em que há o predomínio do clima tropical. As raças compostas têm ganhado espaço na pecuária nacional por serem adaptadas e por produzirem mais carne e de melhor qualidade.

A avaliação da qualidade espermática dos touros pode ser realizada através de testes convencionais e de testes funcionais. A utilização desses testes em conjunto

garante uma maior acurácia na determinação da qualidade seminal. Essas ferramentas auxiliam na identificação de touros férteis, subférteis ou inférteis dentro de um rebanho, evitando quedas nas taxas de prenhez e, conseqüentemente, prejuízos econômicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES. **Pecuária de corte - Raças**. Disponível em: <www.abccriadores.com.br/Racas.aspx>. Acesso em: 17 jul. 2016.

ABHB – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD. **Braford**. Disponível em: <www.abhb.com.br/braford/braford/>. Acesso em: 17 jul. 2016.

ABIEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Perfil da pecuária no Brasil – Relatório anual 2016**. Disponível em: <www.abiec.com.br/Sumario.aspx>. Acesso em: 01 abril 2017a.

ABIEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Exportações brasileiras de carne bovina – jan/2016 – dez/2016**. Disponível em: <www.abiec.com.br/ExportacoesPorAno.aspx>. Acesso em: 01 abril 2017b.

ACNB – ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL. **A origem**. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca>>. Acesso em: 12 jan 2018.

ADDAD, R. O.; FRENEAU, G. E.; RESENDE, L. C.; SILVA, L. M. **Avaliação clínico-andrológica em touros Nelore e testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas**. Ciência Animal Brasileira. v.10, n. 4, p. 1044-1054.2009. Disponível em: <www.revistas.ufg.br/vet/article/view/3395/6004>. Acesso em: 01 dez. 2016.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. **The role of free radicals and antioxidants in reproduction**. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. v. 18, p. 325-332. 2006.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. **Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma**. International Journal of Andrology. v. 25, p. 191-194. 2002.

AITKEN, J.; FISHER, H. **Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk**. BioEssays. v. 16, n. 4, p. 259-267. 1994.

ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2006.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. **In vitro evaluation of sperm quality: an opinion**. Journal of Andrology. v. 14, n. 6, p. 397-406. 1993.

ARRUDA, R. L.; ORRO, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. **Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros**. Rev. Bras. Reprod. Anim. v. 34, n. 3, p. 168-184. 2010.

ASBIA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Relatório INDEX ASBIA – Importação, Exportação e Comercialização de Sêmen - 2011**. Disponível em: <www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf
[17/07/2016](http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf)>. Acesso em: 17 jul. 2016.

AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M.; LANA, A. M. Q.; SAMPAIO, I. B. M.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. **Estimativa de níveis críticos**

superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em lactação. R. Bras. Zootec. v. 34, n. 6, p. 2000 – 2008. 2005.

BARROS, C. M. Q.; OBA, E.; SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; KASTELIC, J. P. **Efeitos da diminuição do fluxo sanguíneo testicular nas temperaturas escrotal superficial, escrotal subcutânea, intratesticular e intravascular em touros.** Ver. Bras. Reprod. Anim. v. 35, n. 1, p. 49-54. 2011.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. **The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls.** Canadian Veterinary Journal. v. 34, p. 93-102. 1994.

BAZER, F. W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. **Fertilização, clivagem e implantação.** In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 6ª ed. São Paulo: Manole. cap. 8, p. 191-193. 1995.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. **Técnicas de análise de sêmen.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. v. 38, n. 4, p. 189-194. 2014.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GABNON, C. **Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.** Mol. Reprod. Dev. v. 55, p. 282-288, 2000.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. **Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação.** Ver. Bras. Reprod. Anim. v. 35, n. 3, p. 303-314. 2011.

BRITO, L. F. C. **Evaluation of stallion sperm morphology**. Clinical Techniques in Equine Practice. v. 6, p. 249-264. 2007.

CARREIRA, J. T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2008.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; BEGHELLI, D. **Effect of supranutritional level of dietary α -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen**. Theriogenology. v. 58, p. 1723-1732. 2002.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^o edição. Belo Horizonte: CBRA. 2013.

CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. Vet. Not. v. 12, n.1, p. 87-93. 2006.

COMPRERURAL – PORTAL DE CONTEÚDO RURAL. **Notícias**. Disponível em: <<https://www.comprerural.com/pqnn-programa-de-qualidade-nelore-natural/>>. Acesso em: 12 jan 2018.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. **Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation**. Microscopy Research and Technique. v. 61, p. 7-17. 2003.

EHRENWALD, E.; FOOTE, R. H.; PARKS, J. E. **Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux.** Molecular Reproduction and Development. v. 25, p. 195-204. 1990.

FERRAZ, H. T.; VIU, M. A. O.; MORAES, M. S.; LOPES, D. T.; FONTANA, C. A. P.; FERRAZ, F. T.; CARMO, L. I. **Morfologia testicular e qualidade seminal em touros: Revisão.** Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 10, n. 9, p. 715-720. 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Ver. Ass. Med. Brasil. v. 43, n. 1, p. 61-68. 1997.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** Biochimica et Biophysica Acta. v. 1469, p. 197-235. 2000.

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

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. **Espermatozóides e Plasma Seminal.** In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 7ª ed. São Paulo: Manole. p. 97-110. 2004.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. **Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides equinos.** Vet. e Zootec. p. 169-180. 2012.

GONÇALVES, A. A.; GARCIA, A. R.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; ARRUDA, R. P.; BARIONI JUNIOR, W.; KAHWAGE, P. R.; SILVA, G. N. **Equivalência de técnicas para avaliação da integridade de membrana plasmática em sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. Anais. 2013.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Anatomia da Reprodução Masculina**. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 7ª ed. São Paulo: manole. p. 03-12. 2004.

HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bull sires**. Tese (Doutorado) – Department of Clinical Sciences – Swedish University of Agricultural Sciences. 2005.

HALLIWELL, B. **Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life**. Plant Physiol. v. 141, n. 2, p. 312-322. 2006.

HANSEN, P. J. **Effects of heat stress on mammalian reproduction**. Phil. Trans. R. Soc.B. v. 364, p. 3341-3350. 2009.

HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; MACIEL, M. N. **Variação temporal na qualidade do sêmen de touros de genótipo puro europeu e sintético derivado**. Ver. Bras. Reprod. Anim. v. 26, n. 4. 2002.

HRUDKA, F. **Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress**. International Journal of Andrology. v. 10, n. 6, p. 809-828. 1987.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias – Brasil – 2015-2015**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default_xls_brasil.shtm>. Acesso em: 30 mar. 2017.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. **Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics**. Journal of Reproduction and Fertility. v. 70, n. 1, p. 219-228. 1984.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. **Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility**. Reprod. Dom. Anim. v. 43, n. 2, p. 368-373. 2008.

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, p. 255-261. 1997.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N.; FARZADI, L. **Fatty acid composition in normozoospermic, asthenozoospermic, asthenoteratozoospermic and oligoasthenoteratozoospermic ejaculates**. Iranian Journal of Reproductive Medicine. v.6, n. 1, p. 39-43. 2008.

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T. A.; PERRI, S. H. V.; VICENTE, W. R. R. **The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil**. Reprod. Dom. Anim. v. 44, p. 587-592. 2009.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSIS, S. S. **Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function.** Indian Journal of Experimental Biology. v. 48, p. 425-435. 2010.

LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. **Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men.** Fertility and Sterility. v. 67, n. 1, p. 142-147. 1997.

MACEDO, G. G.; COSTA e SILVA, E. V.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; MONTEIRO, B. M. **Estresse por calor: Alterações na fisiologia reprodutiva e estratégias para amenizar seus efeitos negativos na fertilidade de fêmeas bovinas.** Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR. v. 16, n. 1, p. 79-85. 2013.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. **Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão.** Rev. Bras. Reprod. Anim. v. 33, n. 4. p. 183-193. 2009.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. **Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v. 57, n. 6. 2005.

MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J. **Aspectos reprodutivos do touro: teoria e prática.** Guaíba: Agrolivros. 280 p. 2015.

MIES FILHO, A.; BARRETO, J. F. **Biologia do espermatozóide. Estudo do sêmen objetivando a prática da inseminação artificial.** In: Noções sobre reprodução dos animais e inseminação artificial. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, p. 162-185. 1949.

OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. **Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica**. Mundo da Saúde. v. 33, n. 4, p. 419-425. 2009.

OLIVEIRA, M. S.; TIBURCIO, M.; FERREIRA, S. G. C. **Influência do estresse térmico sobre a reprodução de bovinos de corte**. Anais Eletrônico: VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica – CESUMAR. 2012.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária. 2007.

OLLERO, M.; GIL-GUZMAN, E.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVENSON, D.; THOMAS, A. J.; ALVAREZ, J. G. **Characterization of subsets of human spermatozoa at diferente stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility**. Human Reproduction. v. 16, n. 9, p. 1912-1921. 2001.

PEREIRA, J. R.; MONTAGNER, M. M.; FLUCK, A. C.; SANTIAGO, A. P.; NERES, M. A. **Efeitos do clima sobre a adaptação e fisiologia de bovinos de corte *Bos taurus x Bos indicus***. Revista Eletrônica de Veterinária. n. 11, v. 18. 2017.

PINHO, R. O.; NEVES, J. G. S.; MONTES, J. C.; FREITAS, B. W.; MARTINS, L. F.; CASTILHO, E. F.; CAMILO, B. S.; GUIMARÃES, J. D. **Maturação espermática durante o trânsito epididimário em um garanhão**. Revista Científica de Medicina Veterinária. ano XIII, n. 25. 2015.

PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E. R. S. **Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability**. Journal of Reproduction and Fertility. v. 118, p. 145-152. 2000.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. **A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa.** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* v. 22, n. 1, p. 87-95. 1991.

ROCHA, C. C. **Avaliações ultrassonográficas, morfométricas e histológicas testiculares de touros *Bos taurus taurus* submetidos a insulação escrotal sob o tratamento sistêmico com antioxidante e suplementado com ácidos graxos poliinsaturados.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2013.

RODRIGUES, A. L. **Utilização de antioxidantes na criopreservação de sêmen da cauda do epidídimo de bovinos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Goiás. Escola de Veterinária. 2011.

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. **Semen evaluation techniques and their relationship with fertility.** *Anim. Reprod.* v. 10, n.3, p. 148-159. 2013.

RURAL CENTRO. **Agro editorial.** Disponível em: <<http://ruralcentro.uol.com.br/analises/nelore-natural-carne-de-qualidade-em-escala-para-o-mercado-interno-3632>>. Acesso em: 12 jan 2018.

SARASWAT, S.; KHARCHE, S. D.; JINDAL, S. K. **Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects**. Iranian Journal of Applied Animal Science. v. 4, n. 2, p. 247-255. 2014.

SETCHELL, B. P. **The effects of heat on the testes of mammals**. Anim. Reprod. v. 3, n. 2, p. 81-91. 2006.

SIKKA, S. C. **Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology**. Journal of Andrology. v. 25, n. 1, p. 5-18. 2004.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. **Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para a redução das crioinjúrias**. Rev. Bras. Reprod. Anim. v. 35, n. 4, p. 370-384. 2011.

SNOECK, P. P. N.; MELO, M. I. V.; ALVES, S. G. G.; BITTENCOURT, R. F.; FILHO, A. L. R.; CHALHOUB, M.; HENRY, M. **Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozóides equino criopreservado?** Rev. Bras. Med. Vet. v. 36, n. 4, p. 355-361. 2014.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. **O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal: meios de defesa contra os radicais livres**. Revista Eletrônica Nutritime. v. 4, n. 3, p. 456-461. 2007.

SOUSA, D. B. **Eventos envolvidos no processo da capacitação espermática *in vivo***. Seminário – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP. 2003.

STOREY, B. T. **Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa.** Molecular Human Reproduction. v. 3, n. 3, p. 203-213. 1997.

TANIGUTI, T. L.; BIRCK, A. J. **Descenso testicular: revisão de literatura.** Universidade Federal do Paraná. _.

TANNO, P. H. **Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. 2009.

TAKAHASHI, L. S.; BILLER, J. D.; TAKAHASHI, K. M. **Bioclimatologia zootécnica.** 1ª Edição, Jaboticabal. 2009.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M. T.; VAISI-RAYGANI, A.; SALIMI, S.; HASSANZADEH, T. **Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa.** International Braz. J. Urol. v. 34 (4), p. 485-491. 2008.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. **Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm.** Biology of Reproduction. New York. v. 59, p. 768-776. 1998.

TURNER, R. M. **Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?** Journal of Andrology. v. 24, n. 6, p. 790-803. 2003.

WISNIEWSKI, P. **Função espermática e reprodutiva em ratos Wistar expostos ao bisfenol A no período pré-adulto**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2013.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; LEITE, P. A.; PASSOS, T. S.; CARRIJO, P. R.; KIEFER, C. **Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservado**. Rev. Bras. Saúde Prod. An. v. 10, n. 3, p. 678-684. 2009.

CAPITULO II

**ASPECTOS QUALI-QUANTITATIVOS DO SÊMEN DE TOUROS DAS RAÇAS
BRAFORN E NELORE CRIADOS EM REGIÃO DE CLIMA TROPICAL**

QUALI-QUANTITATIVE ASPECTS OF BRAFORN AND NELORE BULL SEMEN
CREATED IN TROPICAL CLIMATE REGION

RESUMO

Com o objetivo de determinar o padrão de apresentação de características físicas e funcionais do sêmen de touros das raças Braford e Nelore criados em região de clima tropical, foram avaliadas amostras de sêmen de 15 touros da raça Braford e de 8 da raça Nelore, todos criados extensivamente, sendo realizadas 3 coletas, com intervalo de 2 meses entre cada coleta, nas estações quente seca e quente úmida. Foram realizados os testes convencionais e testes funcionais de avaliação da integridade da membrana plasmática (EOS-NIG), avaliação da integridade da membrana acrossomal (POPE) e avaliação da atividade citoquímica mitocondrial (DAB). Não houve diferença significativa entre as raças no teste de EOS-NIG, a média geral de espermatozoides com membrana plasmática íntegra encontrada para os touros Braford foi de 52,01% e de 36,49% para os touros Nelore. Quanto ao teste de POPE também não houve diferença significativa entre os dois grupos genéticos, a média geral de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra dos touros Braford foi de 98,37% e dos touros Nelore de 99,24%. Não houve diferença significativa entre as raças em relação ao teste de DAB, porém em ambas houve maior prevalência de espermatozoides classe II, com uma média de 87,45% para os touros Braford e de 93,02% para os touros Nelore. Os touros da raça Braford apresentaram parâmetros seminais quali-quantitativos inferiores aos dos touros da raça Nelore. Os touros da raça Braford apresentaram queda na qualidade seminal do meio para o final da estação de monta. Touros da raça Nelore apresentaram boa qualidade seminal em todas as coletas, revelando boa adaptação ao clima quente.

Palavras-chave: adaptação; qualidade espermática; raça sintética.

ABSTRACT

In order to determine the physical and functional characteristics of the semen of Braford and Nelore bulls raised in a tropical region, semen samples of 15 Braford bulls and 8 Nelore bulls were evaluated and 3 samples were collected, with interval of 2 months between each collection, in hot dry and hot humid seasons. The conventional tests and functional tests for evaluating plasma membrane integrity (EOS-NIG), evaluation of acrosomal membrane integrity (POPE) and evaluation of mitochondrial cytochemical activity (DAB) were performed. There was no significant difference between the breeds in the EOS-NIG test, the overall mean plasma sperm count found for Braford bulls was 52.01% and 36.49% for Nelore bulls. As for the POPE test there was also no significant difference between the two genetic groups, the overall spermatozoa with integer diaphragm of Braford bulls was 98.37% and Nelore bulls 99.24%. There was no significant difference between the races in relation to the ABD test, but in both there was a higher prevalence of class II spermatozoa, with a mean of 87.45% for Braford bulls and 93.02% for Nelore bulls. Braford bulls presented qualitative and quantitative seminal parameters lower than those of Nelore bulls. Braford bulls presented a decrease in the seminal quality of the medium for the end of the breeding season. Bulls of the Nelore breed presented good seminal quality in all the collections, showing good adaptation to the hot climate.

Keywords: adaptation; sperm quality; synthetic race.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro é composto, predominantemente, por animais de origem zebuína (*Bos taurus indicus*), principalmente da raça Nelore, reconhecida pela sua adaptação às condições tropicais brasileiras e pela rusticidade (GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017). Devido a necessidade de se produzir mais carne e de melhor qualidade, com atributos sensoriais como maciez, sabor e suculência, a utilização de raças taurinas (*Bos taurus taurus*) tem crescido significativamente. Porém esses animais são pouco adaptados ao clima tropical, o que pode acarretar quadros de subfertilidade (GABALDI e WOLF, 2002).

Com o objetivo de unir características como a rusticidade e adaptabilidade do gado *Bos indicus*, com a produtividade e precocidade do *Bos taurus*, surgiram as raças sintéticas, como o Braford entre tantas outras. Espera-se da raça Braford a fertilidade, habilidade materna, docilidade e precocidade da raça Hereford, com a resistência aos parasitas, adaptação aos trópicos e rusticidade da raça Nelore (ABHB, 2016).

Em relação aos touros Braford, sua adaptação ao clima tropical é fundamental para garantir sua fertilidade, uma vez que o aumento da temperatura testicular pode resultar em aumento no número de espermatozóides com defeitos morfológicos e diminuição da concentração e motilidade espermática (GABALDI e WOLF, 2002). Os espermatozóides anormais, assim como os infiltrados leucocitários, são uma grande fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O desequilíbrio entre a produção de ROS e a quantidade de antioxidantes disponíveis leva ao estresse oxidativo e à danos ao DNA, por exemplo (KOTHARI et al., 2010).

Dessa forma existem diversos testes convencionais e funcionais que visam identificar a composição estrutural e funcional dos espermatozóides (RODRIGUES, 2009). Os testes convencionais determinam o volume do ejaculado, pH, aspecto, turbilhonamento, vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática (CBRA, 2013). Além disso, existem sistemas computadorizados e automatizados de avaliação espermática, como o CASA (Computer-assisted Sperm Analysis), que permitem a análise objetiva da motilidade espermática, avaliando toda a trajetória do espermatozóide por um intervalo de tempo (BERGSTEIN et al., 2014). Já os testes funcionais são mais específicos e analisam, por exemplo, a integridade da membrana

plasmática e membrana acrossomal, por meio de corantes ou citometria de fluxo, e a atividade citoquímica mitocondrial.

O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de apresentação de características físicas e funcionais do sêmen de touros da raça Braford em clima tropical com a variação climática das estações encontradas de quente e seca e quente e úmida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram avaliados 23 touros, sendo 15 da raça Braford, com uma média de peso de 546,2 kg e de 26 meses de idade, e 8 da raça Nelore, com uma média de peso de 650 kg e de 60 meses de idade, criados em sistema extensivo. Todos os touros são usados na reprodução por monta natural a campo, com estação de monta determinada entre dia 15 de novembro e 15 de março, sendo os touros Nelore utilizados na proporção de 1 touro para 25 fêmeas, e os touros Braford na proporção de 1 touro para 33 fêmeas. Os animais foram submetidos a três coletas, com intervalo de 2 meses, sendo a primeira realizada no dia 04 outubro de 2016 (quente seco), a segunda no dia 06 dezembro de 2016 (quente úmido – início da estação de monta) e a terceira no dia 06 fevereiro de 2017 (quente úmido – final da estação de monta).

2.2 LOCAL

Os animais foram provenientes de duas propriedades rurais próximas e localizadas em uma região de clima tropical, na cidade de Rio Verde – GO, sendo os animais da raça Braford da Fazenda Querência, e os animais da raça Nelore da Fazenda São João. Rio Verde está localizada a $-17,785303^{\circ}$ de latitude e $-50,964869^{\circ}$ de longitude, a uma altitude de 780 metros em relação ao nível do mar. Através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) foram obtidas as médias dos índices de temperatura e umidade (ITU) do período de 30 dias antes de cada coleta.

2.3 COLETA

Os touros foram posicionados em tronco de contenção e, primeiramente, realizou-se a avaliação clínica do prepúcio, pênis e bolsa escrotal, seguida da mensuração do perímetro escrotal e da temperatura retal, e, por fim, a palpação retal para verificação da normalidade das glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes. As coletas sempre foram realizadas utilizando o eletroejaculador automático Pulsator IV (Lane Manufacturing Denver, Colorado - USA) que trabalha na forma de uso de uma bateria de 12 Volts/ 5 Amperes, com um ciclo de ondas crescentes em 5 etapas: início, impulso, estímulo, ejaculação e descanso.

2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL

2.4.1 Testes convencionais

Os testes convencionais utilizados neste experimento foram: volume (mL), aspecto (aquoso, seroso, leitoso e cremoso), turbilhonamento (0-5), motilidade progressiva (0-100%) e vigor (0-5), realizados a campo, imediatamente após a coleta, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (2013), enquanto as concentrações e morfologias foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, da Universidade Federal do Tocantins - campus de Araguaína-TO. As avaliações das concentrações espermáticas foram realizadas de acordo com o CBRA (2013) e as morfologias foram analisadas e classificadas de acordo com Barth e Oko (1989) adaptado de Blom (1973), sendo agrupadas em defeitos maiores e menores.

2.4.1.1 Volume, turbilhonamento, vigor e motilidade progressiva

A leitura do volume do ejaculado foi realizada em tubos plásticos graduados de 15 mL. Para as análises do turbilhonamento, vigor e motilidade foi utilizado um microscópio óptico comum, na objetiva de 10X para o turbilhonamento e de 40X para o vigor e motilidade.

2.4.1.2 Concentração espermática

Para a determinação da concentração realizou-se diluição, na proporção de 1:50, em solução de formol-salino, imediatamente após cada coleta a campo. Em laboratório foi realizada a contagem dos espermatozóides utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico comum conectado a um computador pelo programa LAZ 2.0, na objetiva de 40X.

2.4.1.3 Morfologia espermática

Para avaliação da morfologia espermática foi utilizado o método de preparação em câmara úmida, com diluição em solução de formol-salino, analisada no microscópio óptico de contraste de fase, na objetiva de 100X, sob óleo de imersão.

2.4.2 Testes funcionais

Foram realizados três testes funcionais, sendo: avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, e avaliação da atividade citoquímica mitocondrial. Em amostras com aspecto cremoso, ou seja, muito concentradas, foi feita uma diluição utilizando 30 microlitros de sêmen e 30 microlitros de solução de citrato de sódio a 2,94%. As amostras para a realização dos três testes funcionais foram preparadas ainda a campo, logo após a coleta, e analisadas posteriormente em laboratório. Os corantes utilizados nos três testes funcionais foram importados e fracionados pela Neon Comercial e Importação.

2.4.2.1 Integridade da membrana plasmática

A avaliação da integridade da membrana plasmática foi realizada utilizando o método de coloração de Eosina-Nigrosina (EOS-NIG). Dez microlitros de sêmen e dez microlitros de corante foram homogeneizados, colocados em banho-maria a 37 °C por 60 segundos e em seguida feitos os esfregaços. Os espermatozóides foram classificados em corados (membrana plasmática não íntegra) e não corados (membrana plasmática íntegra).

2.4.2.2 Integridade da membrana acrossomal

Para avaliar a integridade da membrana acrossomal foi utilizada a técnica da coloração simples de POPE (POPE et al., 1991). Foram homogeneizados dez microlitros de sêmen e dez microlitros de corante Pope, levados ao banho-maria a 37 °C por 70 segundos e por fim foram feitos os esfregaços. Os espermatozóides foram classificados com acrossomo íntegro (região acrossomal de coloração azul-arroxeadado, um pouco mais escura do que a região pós-acrossomal) e com acrossomo não íntegro (região acrossomal de coloração azul-arroxeadado, mais clara do que a região pós-acrossomal).

As análises dos esfregaços de EOS-NIG e de POPE foram realizadas em microscópio óptico comum conectado a um computador pelo programa LAZ 2.0, na objetiva de 100X, sob óleo de imersão.

2.4.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial

Para a avaliação da atividade citoquímica mitocondrial foi utilizada a solução de DAB (3,3' – diaminobenzidina) desenvolvida por Hrudka (1987). Trinta microlitros de sêmen e trinta microlitros de DAB foram homogeneizados, colocados em banho-

maria a 37 °C por 60 minutos e em seguida realizados os esfregaços. As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico de contraste de fase, na objetiva de 100X, sob óleo de imersão. A classificação foi feita da seguinte forma: Classe I: Peça intermediária totalmente corada – alta atividade mitocondrial (DAB I); Classe II: Peça intermediária parcialmente corada, com predominância de segmentos corados – atividade mitocondrial intermediária (DAB II); Classe III: Peça intermediária parcialmente corada, com predominância de segmentos não corados – baixa atividade mitocondrial (DAB III); Classe IV: Peça intermediária totalmente não corada – ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram os grupos genéticos. Os dados foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste T-Student à 5% de probabilidade de erro. Foram realizadas análises de correlações pelos testes de Spearman e Pearson entre todas as variáveis do ensaio, sendo a escolha do tipo de correlação baseada nos princípios de normalidade e homocedasticidade, sendo o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ITU de 30 dias antes da primeira coleta foi de 70,4, antes da segunda foi de 72,19 e antes da terceira foi de 71,89. A escolha do período de 30 dias antes de cada coleta para a obtenção da média do ITU é justificada pelo fato desse período corresponder a fase de espermiogênese, quando os espermatozóides estão mais suscetíveis às variações climáticas. De acordo com o estudo realizado por Menegassi et al. (2014), um ITU médio no verão de 83,0 não causou danos significativos na morfologia espermática de touros Braford, porém quando observado um ITU de 83,8 18 dias antes da coleta de sêmen houve prejuízos à motilidade, turbilhonamento e vigor espermático.

Em relação à variável temperatura retal, não houve diferença estatística entre os touros das raças Nelore e Braford (39,77 °C e 39,61 °C, respectivamente) ($p > 0,05$). O aumento da temperatura retal pode indicar que os mecanismos de termólise de animais homeotérmicos não estão sendo eficientes, ou seja, a quantidade de calor recebido do ambiente somado com o calor metabólico está sendo maior que a quantidade de calor dissipada para o ambiente (CRUZ et al., 2011). Menegassi et al. (2016), em mensurações realizadas entre os meses de setembro e março em região de clima tropical, encontraram uma temperatura retal média para touros da raça Braford de 39,4 °C e de 39,20 °C para touros da raça Nelore.

As médias do volume do ejaculado não diferiram entre os touros Braford e Nelore (4,16 mL e 6,63 mL, respectivamente) ($p > 0,05$), e estão dentro da normalidade de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) para touros. Quanto ao aspecto do sêmen, 40% das amostras coletadas apresentaram sêmen com aspecto aquoso, dessa porcentagem 33,85% eram de touros Braford, e apenas 6,15% eram de touros Nelore. 29,23% das amostras exibiam um aspecto leitoso, sendo 20% desse total de touros Braford e 9,23% de touros Nelore. Por fim, 30,77% das amostras possuíam aspecto cremoso, 12,31% de touros Braford e 18,46% de touros Nelore. O aspecto do sêmen varia de acordo com a concentração espermática, isto é, o aspecto cremoso indica uma maior concentração de espermatozoides na amostra, seguido do leitoso, seroso e o aquoso (MARTINS; DODE; SILVA, 2016; MARTINS, 2015), como indicaram nossos resultados.

A concentração média das amostras com aspecto cremoso diferiu das amostras com aspecto aquoso ($p \leq 0,05$), para amostras com aspecto aquoso a concentração média encontrada foi de 200×10^6 sptz/mL, já as amostras com aspecto cremoso apresentaram uma média de 522×10^6 sptz/mL. Considerando que a concentração espermática desejável para o ejaculado de bovinos é de aproximadamente 350×10^6 sptz/mL, apenas as amostras com aspecto leitoso (358×10^6 sptz/mL) e cremoso foram satisfatórias (CBRA, 2013). A coleta de sêmen por meio da técnica de eletroejaculação pode exercer influência sobre a concentração espermática, uma vez que o eletroejaculador acentua a secreção das glândulas sexuais acessórias, resultando em uma maior diluição seminal (BERBER, _). Além disso, de acordo com Ruediger et al. (2014), alterações nas temperaturas do escroto

e retal exercem influência sobre a concentração espermática por alterações na espermatogênese.

A tabela 1 descreve e compara os resultados referentes às variáveis motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento.

Tabela 1- Análise estatística das médias \pm erro padrão de motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento de espermatozóides de touros Braford e Nelore.

| | 1º Coleta (Quente e seco) | | 2º Coleta (Quente e úmido) | | 3º Coleta (Quente e úmido) | | Média Total | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|
| | B | N | B | N | B | N | B | N |
| Motilidade progressiva (%) | 56,28 $\pm 5,28$ Aa | 86,95 $\pm 7,22$ Ba | 58,94 \pm 5,28 Aa | 82,43 $\pm 7,22$ Aa | 28,5 $\pm 5,28$ Ab | 66,72 $\pm 7,22$ Ba | 47,91 $\pm 5,28$ | 78,7 $\pm 7,22$ |
| Vigor (1-5) | 2,48 $\pm 0,25$ Aab | 4,5 $\pm 0,34$ Bab | 3,48 $\pm 0,25$ Aa | 4,86 $\pm 0,34$ Ba | 1,52 $\pm 0,25$ Ab | 3,14 $\pm 0,34$ Bb | 2,49 $\pm 0,25$ | 4,17 $\pm 0,34$ |
| Turbilhonamento (1-5) | 2,27 $\pm 0,36$ Aa | 4,75 $\pm 0,49$ Ba | 0,94 $\pm 0,36$ Aa | 2,59 $\pm 0,49$ Aa | 1,34 $\pm 0,36$ Aa | 3,31 $\pm 0,49$ Aa | 1,52 $\pm 0,36$ | 3,55 $\pm 0,49$ |

Letras maiúsculas comparam as raças Braford e Nelore na mesma coleta e letras minúsculas comparam a mesma raça nas três coletas.

Na variável motilidade progressiva houve diferença ($p \leq 0,05$) entre os touros Braford e Nelore na primeira coleta (56,28% \pm 5,28 e 86,95% \pm 7,22, respectivamente) e na terceira coleta (28,5% \pm 5,28 e 66,72% \pm 7,22, respectivamente). Já em relação ao mesmo grupo genético, a motilidade progressiva dos touros Nelore não diferiu estatisticamente ($p \geq 0,05$) nas três coletas, enquanto nos touros Braford a motilidade progressiva das amostras da terceira coleta apresentou diferença ($p \leq 0,05$) em relação à da primeira e da segunda coleta (28,5% \pm 5,28, 56,28% \pm 5,28 e 58,94% \pm 5,28, respectivamente).

Grandes quantidades de espermatozóides com defeitos morfológicos, como as gotas proximais e distais e alterações de cauda, podem resultar em uma diminuição na motilidade espermática (ARRUDA et al., 2015). Além disso, Garcia (2004) observou uma queda na motilidade espermática após a indução da degeneração testicular por insulação testicular. Portanto, a baixa motilidade progressiva encontrada nos touros Braford, pode ser justificada pela presença de grandes quantidades de

espermatozoides anormais em conjunto à um possível quadro de estresse pelo calor intenso.

Houve diferença ($p \leq 0,05$) em relação ao vigor espermático do sêmen dos touros Braford e Nelore da primeira ($2,48 \pm 0,25$ e $4,5 \pm 0,34$, respectivamente), segunda ($3,48 \pm 0,25$ e $4,86 \pm 0,34$, respectivamente) e da terceira coleta ($1,52 \pm 0,25$ e $3,24 \pm 0,34$, respectivamente). O vigor das amostras dos touros Nelore da segunda e terceira coleta apresentou diferença estatística ($p \leq 0,05$) ($4,86 \pm 0,34$ e $3,24 \pm 0,34$, respectivamente), assim como o vigor das amostras dos touros Braford nas mesmas coletas ($3,48 \pm 0,25$ e $1,52 \pm 0,25$, respectivamente). Da mesma forma que a motilidade, o vigor e o turbilhonamento também sofrem redução diante da presença de espermatozoides com defeitos morfológicos, especialmente as gotas citoplasmáticas e defeitos de cauda.

Em relação ao turbilhonamento, foi encontrada diferença ($p \leq 0,05$) apenas entre as amostras da primeira coleta dos touros Braford e Nelore ($2,27 \pm 0,36$ e $4,75 \pm 0,49$, respectivamente). A intensidade do turbilhonamento depende da motilidade, do vigor e da concentração espermática (CBRA, 2013), dessa forma, os valores de turbilhonamento das amostras dos touros Braford foram insatisfatórios, ou seja, abaixo do recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal em todas as coletas.

A tabela 2 descreve e compara os resultados encontrados para porcentagem de defeitos menores, porcentagem de defeitos maiores, gota proximal, cauda fortemente dobrada, cauda dobrada, gota distal, cauda dobrada com gota distal e cauda enrolada na porção terminal.

Tabela 2- Análise estatística das médias \pm erro padrão de defeitos morfológicos de espermatozoides de touros Braford e Nelore.

| | 1º Coleta (Quente e seco) | | 2º Coleta (Quente e úmido) | | 3º Coleta (Quente e úmido) | | Média Total | |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|
| | B | N | B | N | B | N | B | N |
| Def. Menores (%) | 19,63 $\pm 2,64$ Aa | 3,65 $\pm 3,61$ Ba | 14,7 $\pm 2,64$ Aa | 2,22 $\pm 3,61$ Ba | 11,62 $\pm 2,64$ Aa | 1,5 $\pm 3,61$ Ba | 15,31 $\pm 2,64$ | 2,46 $\pm 3,61$ |
| Def. Maiores (%) | 8,77 $\pm 1,35$ Aa | 1,24 $\pm 1,85$ Ba | 8,57 $\pm 1,35$ Aa | 0,59 $\pm 1,85$ Ba | 10,17 $\pm 1,35$ Aa | 0,66 $\pm 1,85$ Ba | 9,17 $\pm 1,35$ | 0,83 $\pm 1,85$ |
| Gota Proximal | 6,72 $\pm 1,35$ Aa | 1,38 $\pm 1,85$ Ba | 6,77 $\pm 1,35$ Aa | 3,07 $\pm 1,85$ Aa | 7,88 $\pm 1,35$ Aa | 1,75 $\pm 1,85$ Aa | 7,13 $\pm 1,35$ | 2,07 $\pm 1,85$ |
| Cauda Fort. Dobrada | 8,5 $\pm 2,13$ Aa | 6,67 $\pm 2,92$ Aa | 10,08 $\pm 2,13$ Aa | 1 $\pm 2,92$ Ba | 13,23 $\pm 2,13$ Aa | 1,5 $\pm 2,92$ Ba | 10,6 $\pm 2,13$ | 3,06 $\pm 2,92$ |
| Cauda Dobrada | 3,24 $\pm 0,78$ Aa | 3,64 $\pm 1,06$ Aa | 2,93 $\pm 0,78$ Aa | 1,78 $\pm 1,06$ Aa | 4,54 $\pm 0,78$ Aa | 1,81 $\pm 1,06$ Aa | 3,57 $\pm 0,78$ | 2,41 $\pm 1,06$ |
| Gota Distal | 29,73 $\pm 5,62$ Aa | 3,28 $\pm 7,68$ Ba | 27,75 $\pm 5,62$ Aa | 3,42 $\pm 7,68$ Ba | 9,97 $\pm 5,62$ Aa | 3,43 $\pm 7,68$ Aa | 22,48 $\pm 5,62$ | 3,38 $\pm 7,68$ |
| Cauda Dob. Gota Distal | 2,26 $\pm 0,39$ Aa | 1 $\pm 0,53$ Aa | 1,8 $\pm 0,39a$ | - | 3,43 $\pm 0,39$ Aa | 1 $\pm 0,53$ Aa | 2,5 $\pm 0,39$ | 0,7 $\pm 0,53$ |
| Cauda Enro. Porção Ter. | 3,89 $\pm 0,75$ Aa | 1,19 $\pm 1,03$ Aa | 3,67 $\pm 0,75$ Aa | 1,39 $\pm 1,03$ Aa | 8,1 $\pm 0,75$ Ab | 0,9 $\pm 1,03$ Ba | 5,22 $\pm 0,75$ | 1,16 $\pm 1,03$ |

Letras maiúsculas comparam as duas raças na mesma coleta e letras minúsculas comparam a mesma raça nas três coletas.

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) na porcentagem de defeitos menores entre amostras seminais dos touros Braford nas três coletas, assim como não houve entre as amostras dos touros Nelore. Já entre as amostras dos touros Braford e Nelore houve diferença ($p \leq 0,05$) em todas as coletas. É desejável que o total de defeitos menores do ejaculado seja menor ou igual a 20% (CBRA, 2013), sendo assim tanto as amostras dos touros Braford quanto dos touros Nelore se mantiveram dentro do limite recomendado por este colégio.

Dentro dos defeitos menores houve destaque para cauda dobrada, gota distal, cauda dobrada com gota distal e cauda enrolada na porção terminal. Em relação à cauda dobrada não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos genéticos, e

também não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre as coletas nas amostras seminais dos touros Braford e Nelore. Alterações da cauda ocorrem durante o trânsito pelo epidídimo, durante o processo de maturação espermática, e podem ser causadas por choque osmótico ou choque térmico (ARRUDA et al., 2015).

Quanto à ocorrência de gota distal, houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as amostras seminais de Braford e Nelore da primeira coleta ($29,73 \pm 5,62$ e $3,28 \pm 7,68$, respectivamente) e da segunda coleta ($27,75 \pm 5,62$ e $3,42 \pm 7,68$, respectivamente). Em animais adultos, quadros de degeneração do epitélio seminífero causados por estresse térmico levam ao aparecimento de gotas citoplasmáticas distais e proximais (MARTINS; DODE; SILVA, 2016). Além disso, animais com quadros de disfunção da cauda do epidídimo, seja por fatores bioquímicos, infecciosos ou genéticos, apresentam alta incidência de espermatozóides com caudas dobradas e gota citoplasmática proximal ou distal (VALE FILHO et al., 2010).

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre a ocorrência de cauda dobrada com gota distal no sêmen de touros Braford e Nelore em nenhuma das coletas, e nem entre as coletas com relação ao mesmo grupo genético. Já sobre o aparecimento de espermatozóides com cauda enrolada na porção terminal houve diferença ($p \leq 0,05$) apenas entre as amostras de touros Braford e Nelore da terceira coleta ($8,15 \pm 0,75$ e $0,9 \pm 1,03$, respectivamente).

Os defeitos maiores estão mais relacionados à quadros de infertilidade e doenças testiculares ou epididimárias do que os defeitos menores. Em relação à essa variável houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as amostras seminais de touros Braford e Nelore em todas as coletas ($8,77\% \pm 1,35$ e $1,24\% \pm 1,85$, respectivamente, na primeira; $8,57\% \pm 1,35$ e $0,59\% \pm 1,85$, respectivamente, na segunda; e $10,17\% \pm 1,35$ e $0,6\% \pm 1,85$, respectivamente, na terceira). Apenas na terceira coleta os touros Braford ultrapassaram o valor recomendado pelo CBRA para defeitos maiores que é de até 10%, isso significa que acima desse valor pode haver prejuízos na fertilidade do animal.

Entre os defeitos maiores destacaram-se a gota proximal e a cauda fortemente dobrada. Com relação à gota proximal só houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as amostras dos touros Braford e Nelore na primeira coleta ($6,72 \pm 1,35$ e $1,38 \pm 1,85$, respectivamente). A alta incidência de espermatozóides com gotas proximais no

ejaculado de touros adultos sugere processo de degeneração testicular, geralmente causado por estresse prolongado por calor (ARRUDA et al., 2015; GABALDI e WOLF, 2002). Já em touros jovens, o aparecimento de grandes quantidades de espermatozóides com gota proximal se deve à imaturidade sexual (BARTH e OKO, 1989). Como em nosso estudo a idade média dos touros Braford foi de 26 meses, ou seja, já atingiram a maturidade sexual, descarta-se essa hipótese.

Quanto a cauda fortemente dobrada, houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as amostras dos touros Braford e Nelore na segunda ($10,08 \pm 2,13$ e $1 \pm 2,92$, respectivamente) e na terceira coleta ($13,23 \pm 2,13$ e $1,5 \pm 2,92$, respectivamente). Assim como a gota proximal, a alta incidência de cauda fortemente dobrada no ejaculado de touros adultos é um indicativo de estresse térmico com consequente quadro de degeneração testicular (MARTINS; DODE; SILVA, 2016; GARCIA, 2004).

Com um aumento na frequência de ejaculações, consequentemente há uma diminuição de cerca de 10 a 20% no tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo (GARNER; HAFEZ, 2004), o que ocorre quando os touros estão em estação de monta. No caso do presente estudo isso ocorreu no período em que foi realizada a segunda e a terceira coleta de sêmen de todos os touros. Essa diminuição no tempo de trânsito pelo epidídimo pode levar à prejuízos no processo de maturação espermática, resultando em um aumento no aparecimento de espermatozóides com gotas proximais e distais, e também com alterações de cauda, como cauda dobrada e cauda fortemente dobrada. Essas patologias, por sua vez, resultam numa queda da motilidade progressiva, do vigor e do turbilhonamento da amostra.

A tabela 3 descreve e compara os resultados referentes à porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (EOS-NIG), porcentagem de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra (POPE), porcentagem de espermatozóides classe I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB).

Tabela 3- Análise estatística das médias \pm erro padrão dos testes funcionais de espermatozóides de touros Braford e Nelore.

Letras maiúsculas comparam as duas raças na mesma coleta e letras minúsculas comparam a mesma raça nas três coletas.

| | 1º Coleta (Quente e seco) | | 2º Coleta (Quente e úmido) | | 3º Coleta (Quente e úmido) | | Média Total | |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------|----------------|----------------|
| | B | N | B | N | B | N | B | N |
| EOS-NIG (% Normais) | 27,89 ±6,96 Aa | 11,93 ±9,52 Aa | 66,39 ±6,96 Ab | 38,63 ±9,52 Aab | 61,75 ±6,96 Ab | 58,92 ±9,52 Ab | 52,01 ±6,96 | 36,49 ±9,52 |
| POPE (% Normais) | 97,36 ±0,59 Aa | 96,4 ±0,8 Aa | 99,06 ±0,59 Aa | 99,36 ±0,8 Aa | 98,69 ±0,59 Aa | 99,21 ±0,8 Aa | 98,37 ±0,59 | 99,24 ±0,8 |
| DAB Classe I (%) | 4,34 ±1,19 Aa | 6,02 ±1,63 Aa | 5,9 ±1,19 Aa | 5,17 ±1,63 Aa | 4,67 ±1,19 Aa | 3,53 ±1,63 Aa | 4,97 ±1,19 | 4,91 ±1,63 |
| DAB Classe II (%) | 91,8 ±4,64 Aa | 94,34 ±6,35 Aa | 80,1 ±4,64 Aa | 84,51 ±6,35 Aa | 90,44 ±4,64 Aa | 95,36 ±6,35 Aa | 87,45 ±4,64 | 93,02 ±6,35 |
| DAB Classe III (%) | 3,57 ±3,09 Aa | 3,5 ±4,23 Aa | 7,03 ±3,09 Aa | 14,29 ±4,23 Aa | 3,74 ±3,09 Aa | 1,93 ±4,23 Aa | 4,78 ±3,09 | 6,57 ±4,23 |
| DAB Classe IV (%) | 1,43 ±3,16 Aa | 0,81 ±4,33 Aa | 8,1 ±3,16 Aa | 1,86 ±4,33 Aa | 1,54 ±3,16 Aa | 0,14 ±4,33 Aa | 3,69 ±3,16 | 0,94 ±4,33 |

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (EOS-NIG) não apresentou diferença ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos genéticos em todas as coletas, já entre as amostras seminais de touros Braford houve diferença ($p \leq 0,05$) entre a primeira e as demais coletas (27,89% \pm 6,96 na primeira, 66,39% \pm 6,96 na segunda e 61,75% \pm 6,96 na terceira), e entre as amostras dos touros Nelore houve diferença ($p \leq 0,05$) entre a primeira e a terceira coleta (11,93% \pm 9,52 e 58,92% \pm 9,52, respectivamente). Rodrigues (2009) encontrou uma média de 19,75% de espermatozoides com membrana plasmática íntegra em amostras seminais criopreservadas de touros Nelore, e 18,87% em amostras criopreservadas de touros Simental.

A perda da integridade da membrana plasmática ocorre pelo estresse oxidativo, sendo esse desencadeado pelo desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes (KOTHARI et al., 2010). A maior produção de ROS se dá por infiltrados leucocitários e também por espermatozoides com defeitos morfológicos, dentre eles, principalmente os que possuem resíduos de citoplasma (gota citoplasmática) (AITKEN e BARKER, 2002). Portanto, a própria presença de

espermatozóides defeituosos pode contribuir para a perda da integridade da membrana plasmática. O percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra em ambas as raças neste estudo foi menor na primeira coleta, em que todos os animais estavam em repouso, sendo assim esses espermatozóides podem ter sofrido maior ação das ROS devido ao maior tempo de exposição.

Além disso, Garcia (2004) demonstrou evidente efeito do estresse térmico sobre o número de espermatozóides com membrana plasmática lesada, segundo ele devido às alterações de ambiente nos túbulos seminíferos, que possivelmente modifica o metabolismo de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides, além de provavelmente influenciar na ação das células de Leydig e Sertoli.

Em relação à integridade da membrana acrossomal (POPE) não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos genéticos, e nem entre as coletas dentro um mesmo grupo genético. A média total de espermatozóides de touros Braford com a membrana acrossomal íntegra foi de $98,37\% \pm 0,59$, enquanto a média dos touros Nelore foi de $99,24\% \pm 0,8$. Uma membrana acrossomal íntegra é indispensável para o sucesso da fertilização, isso porque no acrossomo estão contidas as enzimas acrossomais, que são liberadas durante a reação acrossomal permitindo a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e sua fusão com a membrana plasmática do oócito (FLESCHE e GADELLA, 2000; RODRIGUES, 2009).

Na avaliação da atividade citoquímica mitocondrial (DAB) não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos genéticos em nenhuma das coletas, e nem entre as coletas dentro do mesmo grupo genético. Em ambas as raças e em todas as coletas foi observada uma maior porcentagem de espermatozóides classe II (atividade mitocondrial intermediária), sendo que a média geral de espermatozóides classe II foi de $87,45\% \pm 4,64$ nas amostras seminais dos touros Braford e $93,02\% \pm 6,35$ nas amostras dos touros Nelore. De acordo com Makker et al. (2009) as ROS também causam danos na membrana mitocondrial, e esses danos desencadeiam o aumento na produção de ROS.

Tabela 4 - Correlações entre variáveis físicas do sêmen de touros da raça Braford e da raça Nelore.

| | TUR. | MOT. | VIG. | G. P. | C. F. D. | C. D. | G. D. | C. D. G. D. | C. E. P. T. | P. D. Ma. | P. D. Me. | POPE | EOS-NIG | DAB I | DAB II | DAB III | DAB IV |
|-------------|------|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| TUR. | 1,0 | 0,72 (<0001) | 0,54 (<0001) | - 0,5 (0,0001) | - 0,23 (0,09) | - 0,06 (0,72) | - 0,31 (0,03) | - 0,27 (0,22) | - 0,15 (0,31) | - 0,41 (0,0008) | - 0,32 (0,009) | - 0,28 (0,03) | - 0,48 (<0001) | - 0,08 (0,5) | 0,31 (0,01) | - 0,28 (0,025) | - 0,26 (0,04) |
| MOT. | . | 1,0 | 0,91 (<0001) | - 0,54 (<0001) | - 0,38 (0,005) | - 0,12 (0,43) | - 0,19 (0,19) | - 0,61 (0,002) | - 0,45 (0,002) | - 0,54 (<0001) | - 0,37 (0,003) | - 0,18 (0,17) | - 0,34 (0,006) | - 0,13 (0,29) | 0,14 (0,25) | - 0,15 (0,22) | - 0,15 (0,23) |
| VIG. | . | . | 1,0 | - 0,49 (0,0002) | - 0,35 (0,01) | - 0,1 (0,52) | - 0,21 (0,14) | - 0,53 (0,009) | - 0,42 (0,004) | - 0,55 (<0001) | - 0,41 (0,0007) | - 0,09 (0,49) | - 0,25 (0,05) | - 0,18 (0,14) | 0,12 (0,34) | - 0,09 (0,43) | - 0,13 (0,31) |
| G. P. | . | . | . | 1,0 | 0,34 (0,02) | - 0,19 (0,27) | 0,46 (0,001) | 0,33 (0,13) | 0,42 (0,005) | 0,75 (<0001) | 0,59 (<0001) | 0,18 (0,21) | 0,26 (0,06) | 0,31 (0,02) | - 0,31 (0,03) | 0,31 (0,02) | 0,17 (0,22) |
| C. F. D. | . | . | . | . | 1,0 | 0,16 (0,36) | 0,31 (0,04) | 0,18 (0,43) | 0,43 (0,005) | 0,87 (<0001) | 0,68 (<0001) | - 0,17 (0,25) | - 0,11 (0,43) | 0,14 (0,34) | - 0,14 (0,05) | 0,27 (0,05) | 0,21 (0,13) |
| C. D. | . | . | . | . | . | 1,0 | - 0,08 (0,64) | 0,57 (0,02) | 0,09 (0,59) | 0,03 (0,86) | 0,15 (0,33) | - 0,25 (0,12) | - 0,002 (0,99) | - 0,11 (0,47) | 0,01 (0,93) | 0,08 (0,6) | 0,02 (0,9) |
| G. D. | . | . | . | . | . | . | 1,0 | - 0,01 (0,96) | - 0,13 (0,42) | 0,46 (0,0008) | 0,88 (<0001) | 0,04 (0,79) | 0,15 (0,29) | 0,09 (0,55) | - 0,19 (0,19) | 0,22 (0,12) | 0,14 (0,35) |
| C. D. G. D. | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | 0,37 (0,12) | 0,34 (0,12) | 0,33 (0,12) | - 0,24 (0,31) | 0,27 (0,21) | 0,09 (0,68) | - 0,2 (0,37) | 0,29 (0,18) | 0,3 (0,16) |
| C. E. P. T. | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | 0,52 (0,0002) | 0,31 (0,04) | 0,03 (0,85) | 0,13 (0,38) | 0,18 (0,22) | 0,04 (0,8) | - 0,04 (0,77) | - 0,009 (0,95) |
| P. D. Ma. | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | <0001 | 0,74 (0,61) | - 0,07 (0,67) | 0,05 (0,36) | - 0,16 (0,19) | 0,28 (0,02) | 0,17 (0,19) |
| P. D. Me. | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | - 0,03 (0,82) | 0,08 (0,51) | 0,19 (0,13) | - 0,33 (0,007) | 0,37 (0,002) | 0,29 (0,02) |
| POPE | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | 0,48 (<0001) | 0,27 (0,03) | - 0,29 (0,01) | 0,02 (0,86) | 0,05 (0,68) |
| EOS-NIG | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | 0,2 (0,11) | - 0,29 (0,02) | 0,16 (0,2) | 0,13 (0,31) |
| DAB I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | - 0,63 (<0001) | 0,21 (0,09) | 0,19 (0,13) |
| DAB II | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | - 0,70 (<0001) | - 0,64 (<0001) |
| DAB III | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 | 0,57 (<0001) |
| DAB IV | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1,0 |

TUR.: turbilhonamento; MOT.: motilidade progressiva; VIG.: vigor; G. P.: gota proximal; C. F. D.: cauda fortemente dobrada; C. D.: cauda dobrada; G. D.: gota distal; C. D. G. D.: cauda dobrada com gota distal; C. E. P. T.: cauda enrolada na porção terminal; P. D. Ma.: porcentagem de defeitos maiores; P. D. Me.: porcentagem de defeitos menores.

A tabela 4 aborda as correlações obtidas entre as variáveis turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, gota proximal, cauda fortemente dobrada, cauda dobrada, gota distal, cauda dobrada com gota distal, cauda enrolada na porção terminal, porcentagem de defeitos maiores, porcentagem de defeitos menores, porcentagem de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra (POPE), porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (EOS-NIG), e porcentagem de espermatozóides classe I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB). As correlações foram analisadas com os dois grupos genéticos em conjunto.

Foi observada uma correlação negativa média entre a porcentagem de defeitos maiores e turbilhonamento (-0,41; $p=0,0008$), motilidade progressiva (-0,54; $p<0,0001$) e vigor (-0,55; $p<0,0001$). Da mesma forma entre a porcentagem de defeitos menores e turbilhonamento (-0,32; $p=0,009$), motilidade progressiva (-0,37; $p=0,003$) e vigor (-0,41; $p=0,0007$). Esses resultados confirmam que quanto maior for a porcentagem de defeitos maiores e menores, menor será a motilidade progressiva, o vigor e o turbilhonamento da amostra.

Foi encontrada correlação positiva média entre EOS-NIG e POPE (0,48; $p<0,0001$), ou seja, quanto maior a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, maior a porcentagem de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra. Evidenciando que quando uma membrana for lesionada, provavelmente a outra também será.

Houve uma baixa correlação positiva entre DAB II e turbilhonamento (0,31; $p=0,01$), indicando que quanto maior a porcentagem de espermatozóides DAB classe II, maior será o turbilhonamento da amostra. Foi observada também uma baixa correlação negativa entre DAB II e a porcentagem de defeitos menores (-0,33; $p=0,007$), isto é, quanto maior a porcentagem de espermatozóides com atividade citotóxica mitocondrial intermediária, menor será a porcentagem de espermatozóides com defeitos menores.

Em relação à DAB III, foi encontrada uma baixa correlação positiva com a porcentagem de defeitos maiores (0,28, $p=0,02$) e com a porcentagem de defeitos menores (0,37; $p=0,002$), o que significa que que a medida que aumenta a porcentagem de espermatozóides com baixa atividade citotóxica mitocondrial,

aumenta também a porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores e menores na amostra.

Por fim, foi observada uma baixa correlação positiva entre DAB IV e a porcentagem de defeitos menores (0,29; $p=0,02$), o que significa que quanto maior a porcentagem de espermatozoides sem atividade citoquímica mitocondrial, maior será a porcentagem de espermatozoides com defeitos menores.

4. CONCLUSÃO

Os touros da raça Braford apresentaram parâmetros seminais quali-quantitativos inferiores aos dos touros da raça Nelore em clima tropical.

Houve redução dos parâmetros seminais quali-quantitativos dos touros da raça Braford do meio para o final da estação de monta.

Os touros da raça Nelore apresentaram boa qualidade seminal em todas as coletas, não havendo quedas expressivas devido à estação de monta, reafirmando, inclusive, boa adaptação ao clima quente e úmido.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHB – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD. **Braford**.

Disponível em: www.abhb.com.br/braford/braford/. Acesso em: 17 jul. 2016.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. **Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma**. International Journal of Andrology. v. 25, p. 191-194. 2002.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R. et al. **Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade**. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v. 39, n. 1, p. 47-60. 2015.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, p. 285. 1989.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, p. 285. 1989. Adaptado de: BLOM, E. **The ultrastructure of some characteristic Sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram**. 1973.

BERBER, R. C. A. Coleta e processamento de sêmen bovino. Disponível em: <http://globalgenetics.blogspot.com.br/p/artigos.html>. Acesso em 13 de novembro de 2017.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. **Técnicas de análise de sêmen**. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v. 38, n. 4, p. 189-194. 2014.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^o edição. Belo Horizonte: CBRA. 2013.

CRUZ, L. V.; ANGRIMANI, D. S. R.; RUI, B. R.; SILVA, M. A. **Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano IX, n. 16. 2011.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization**. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1469, p. 197-235. 2000.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. **A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros**. Ciências Agrárias e da Saúde. v. 2, n. 2, p. 66-70. 2002.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da Somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2004.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. **Espermatozóides e plasma seminal**. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7^o Edição. p. 97-110. 2004.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. **Evolução e qualidade da pecuária brasileira**. Embrapa Gado de Corte. 2017.

HRUDKA, F. **Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress**. International Journal of Andrology. v. 10, n. 6, p. 809-828. 1987.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Conforto Térmico**

Bovino. Disponível em:

<http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/climatologia/confortotermicobovino>. Acesso em: 16 out. 2017.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSIS, S. S. **Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function**. Indian Journal of Experimental Biology. v. 48, p. 425-435. 2010.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. **Oxidative stress & male infertility**. Indian Journal Medical Research. v.129, p. 357-367. 2009.

MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. **Atlas de morfologia espermática bovina**. Embrapa. 2016.

MARTINS, R. T. **Avaliação reprodutiva em touros**. Monografia (Graduação) – Universidade Tuiuti do Paraná. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde. 2015.

MENEGASSI, S. R. O.; PEREIRA, G. R.; BREMM, C.; KOETZ, C. JR.; LOPES, F. G.; FIORENTINI, E. C.; McMANUS, C.; DIAS, E. A.; ROCHA, M. K.; LOPES, R. B.; BARCELLOS, J. O. J. **Effects of ambient air temperature, humidity, and wind**

speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal.

International Journal of Biometeorology. v. 60, n. 11, p. 1787-1794. 2016.

MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J.; DIAS, E. A.; KOETZ, C. JR.;

PEREIRA, G. R.; PERIPOLLI, V.; McMANUS, C.; CANOZZI, M. E. A.; LOPES, F. G.

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. 2014.

MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J.; PERIPOLLI, V.; PEREIRA, P. R. R.

X.; BORGES, J. B. S.; LAMPERT, V. N. **Measurement of scrotal circumference in**

beef bulls in Rio Grande do Sul. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e

Zootecnia. v.63, n. 1. 2011.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. **A simple staining method for**

evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. Journal of Zoo and Wildlife

Medicine. v. 22, n. 1, p. 87-95. 1991.

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen**

criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em

clima tropical. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009.

RUEDIGER, F. R.; CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; AMORIM, A. R.; SOUZA, C. D. **Termografia digital por infravermelho do escroto e qualidade do sêmen em touros Nelore (*Bos taurus indicus*)**. Colloquium Agrariae. v. 10, n. 2, p. 67-74. 2014.

SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; CORDEIRO, C. M. T.; FREITAS, A. R. **Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO**. Revista Brasileira de Zootecnia. v. 31, n. 3, p. 1157-1165. 2002.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V. J.; AZEVEDO, N. A. **Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução**. In: III Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte. p. 363-412. 2010.