



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**ONEL SOLANO GARCIA**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA INSULAÇÃO TESTICULAR  
EM BUBALINOS**

**Belém**  
**2009**

**ONEL SOLANO GARCIA**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA INSULAÇÃO TESTICULAR  
EM BUBALINOS**

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

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. William Gomes Vale

Co-orientador: Prof. Dr. Haroldo Francisco Ribeiro  
Lobato

**Belém  
2009**

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

---

Garcia, Onel Solano

Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos / Onel Solano Garcia;  
orientadores, William Gomes Vale, Haroldo Francisco Ribeiro Lobato - 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e  
Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2009.

1. Búfalo. 2. Testículos. 3. Sêmen. 4. Calor – Efeito fisiológico. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.293

---

**ONEL SOLANO GARCIA**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA INSULAÇÃO TESTICULAR  
EM BUBALINOS**

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

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém-PA:    /    /

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. William Gomes Vale  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

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

---

Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia  
Embrapa Amazônia Oriental

A meus pais, Hilaria e Roberto Solano por todos os momentos de apoio, carinho e amor. A meu irmão Omar pela força e ajuda incondicional, sem ele a vida seria mais difícil.

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser fonte de força, proteção, inspiração.

Aos meus pais e irmão, Roberto Solano, Hilaria Garcia e Omar Solano pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao Professor Dr. William Gomes Vale pela oportunidade, paciência, dedicação e valiosas orientações que me ensinaram e incentivaram desde o início. Muito obrigado.

Ao Professor Dr. Haroldo Francisco Ribeiro Lobato pelas valiosas sugestões nos momentos mais difíceis, pelo apoio e ajuda incondicional que me ofereceu em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Alexandre Rossetto Garcia, pela oportunidade oferecida na EMBRAPA, pela paciência e interesse em me ajudar, pela ajuda tanto na fase experimental quanto na elaboração da dissertação, pelas valiosas sugestões e pela força dada nos momentos mais críticos.

Ao Professor Washington Luiz pela paciência, interesse e ajuda incalculável na realização dos exames histopatológicos, pois sem sua ajuda não tivesse sido possível esta fase do experimento.

A Eduardo Daher por ceder os animais para a realização do experimento e pela ajuda sempre oferecida em todo momento.

Ao Benjamim Naún, Talmir Quinzero, aos funcionários da Filisberto Camargo (Tio, Natanael, Portal, Jurandir e o Josué), que sem ajuda de todos nada disto seria possível.

Aos prof. Aluisio e prof. Sousa pela oportunidade de realizar o experimento na CEBRAN.

A minha namorada Laura pelo amor e carinho, compressão e apoio em todos estes anos.

Ao Alysson, Adrienne, Gilson, a Josy, Dona Marilena, Lucilene, Sr. Mile, Bicudo, Pedro, Julho, e a todos os que de uma forma ou outra me ofereceram sua ajuda na CEBRAN.

A dona Maria, mãe do Sebastião e Lidiana Ribeiro, por todo o apoio, conselhos e carinho em todos os momentos.

A Sebastião Tavares Rolim Filho por toda a força, ajuda e apoio desde o começo, a qual agradeço tudo este trabalho, e que sem ele não seria possível este momento.

Elizabeth Machado Barbosa quem nos últimos momentos me incentivou, e a qual devo grande parte destes resultados.

A Bruno Filgueiras pela sua amizade, apoio incondicional em todos os momentos e grande colaboração neste trabalho.

Aos colegas de mestrado: Leonardo Brandão, Rafaela Nunes, Kim Borborema, Sandra, Jean leão, Fábio Pytortelli.

Aos amigos Bruno Pinto, Jorge Bolívar, André Reale, Cristine Reale e Henry Manrique.

Aos estagiários: Michel, Samuel, Danilo e Eliomar pelo longo caminho que juntos percorremos para chegar até aqui.

A José Martinez da Pfizer, pela grande ajuda com os hormônios, pelos conselhos, pela amizade oferecida.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental pela colaboração e apoio ao ceder animais, funcionários, instalações e equipamentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro que viabilizou tanto o desenvolvimento experimental do projeto “Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos”.

À Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e a Embrapa Amazônia Oriental, através do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade.

A todos que de alguma maneira ajudaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

Muito obrigado!

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações morfo-funcionais dos testículos de bubalinos provocadas pela insulação escrotal. O experimento foi conduzido na CEBRAN - UFPA e na EMBRAPA e dividido em cinco fases: período pré-insulação (PI), insulação (I) pós-insulação até trinta dias (P30), até sessenta (P60) e até noventa (P90). Utilizaram-se seis búfalos com idade média de  $50 \pm 2$  meses. Antes da insulação foram realizadas colheitas de sêmen para avaliação das características físicas e morfológicas dos ejaculados. Em seis animais foram utilizadas bolsas, fixadas ao redor do funículo por sete dias, sendo verificada a temperatura retal, temperatura do funículo e a temperatura entre a pele do escroto e o saco plástico, em diferentes horários. Obtiveram-se de 1 a 2 colheitas de sêmen, através da vagina artificial, com temperatura entre  $44^{\circ}\text{C}$  a  $46^{\circ}\text{C}$ , e avaliados vários aspectos como: turbilhonamento (TURB), motilidade (MOT), concentração (CONC), vivos e mortos, pH e patologias seminais, além do exame histopatológico dos testículos. As lâminas para análises das patologias foram coradas pelo método de Cerovsky. A insulação não afetou significativamente a volume do ejaculado. O TURB diminuiu significativamente no período de insulação, P30 e P60, não obtendo diferença significativa no P90 quando comparada com o PI. A MOT diminuiu significativamente no P30, P60 e P90 quando comparada com o período de pré insulação e insulação. O vigor espermático apresentou diminuição no P30 em relação ao PI, I, P60 e P90. A concentração não apresentou diferença significativa entre os períodos avaliados. A viabilidade apresentou uma queda no P30 quando comparado ao PI, I, P60 e P90. Ocorreu diferença significativa no pH nos períodos P60 e P90 em relação a PI, I, P30. Houve diferença estatística, quanto aos defeitos maiores do sêmen, antes e depois da insulação, sendo I e P30 os períodos mais criticos quando comparado com P60 e P90. Quanto aos defeitos menores, houve diferença significativa entre P30 e PI, P60 e P90. Os defeitos totais evidenciaram diferença estatística no P30 em relação ao PI, I, P60 e P90. Foram avaliados as modificações histológicas-testicular provocados pela insulação, nos dias 20, 40 e 60 pós-insulação, ocasionado um quadro degenerativo acentuado, havendo uma regeneração do processo espermatogênico na maioria dos animais estudados. Estes dados demonstraram que o estresse térmico causou efeitos deletéricos na espermatogênese e no processo de maturação dos espermatozoides.

**PALAVRAS-CHAVE:** Andrologia, búfalos, degeneração testicular, sêmen



## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the morphological and functional buffaloes testis's alterations caused by insulation. The experiment was conducted at the UFPA and EMBRAPA and divided into five phases: pre-insulating (PI), insulation (I) after insulation up to thirty days (P30), within sixty (P60) and up to ninety (P90). It was used six buffaloes with mean age of  $50 \pm 2$  months. Before the insulation, the samples were collected to evaluate semen physical characteristics and morphology of ejaculated. In six animals were used bags to fix around the cord and scrotum. For seven days were checked the rectal's temperature, the cord's temperature and the temperature between the skin of the scrotum and the plastic bag, at different times. There were obtained 1 to 2 samples of semen by artificial vagina, with temperatures between 44 to 46 C, and evaluated aspect, turbulence (TURB), motility (MOT), concentration (CONC), living and dead, seminal pH and diseases, besides the testis's histopathology. The laminas were colored with Cerovsky to evaluate spermatozoids morphology characteristics. Insulation did not significantly affect the volume of ejaculate. TURB was significantly reduced in the insulating, P30 and P60, did not get any significant difference in P90 days compared with the PI. The MOT decreased significantly during P30, P60 and P90 compared with pre insulation and insulating. The sperm vigor presented a decrease in P30 compared with PI, I, P60 and P90. The concentration was not significantly different among the periods. The viability showed a decrease in P30 when compared to PI, I, P60 and P90. Significant difference in pH during periods P60 and P90 compared to PI, I, P30. There was statistical difference, as the major defects of semen, before and after insulation, I and P30 were compared with P60 and P90. The minor defects had a significant difference between P30 and PI, P60 and P90. The total defects showed statistical difference in P30 compared with PI, I, P60 and P90. The buffaloes were submitted to the unilateral orchiectomy throughout the 20, 40 and 60 days after insulation with the purpose of confronting the microscopic findings with the physical and morphologic exam of the semen, causing an accentuated degenerative picture on the spermatogenic epithelium which regenerated in spite of the establishment of a degenerative process in the gonads. These data demonstrate that heat stress caused deleterious effects on spermatogenesis and the maturation of sperm.

**KEY-WORDS:** Andrology, buffaloes, testicular degeneration, sperm

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
<b>Foto 1</b> Localização da Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN) (1A) e da Unidade de Pesquisa Animal “Dr. Felisberto Camargo” (EMBRAPA) (1B).....	34
<b>Foto 2</b> Animais submetidos à insulação testicular – CEBRAN (2A) e Unidade de Pesquisa Animal “Dr. Felisberto Camargo” – EMBRAPA (2B).....	35
<b>Foto 3</b> Medição da temperatura retal (3A) e da temperatura no interior da bolsa testicular (3B) em animais insulados.....	37
<b>Foto 4</b> Sêmen coletado usando búfala como manequim na CEBRAN (4A) e na EMBRAPA (4B).....	38
<b>Foto 5</b> Coloração Eosina – Nigrosina para contagem de vivos e mortos. Obj. 200X.....	40
<b>Foto 6</b> Preparação úmida - formol salino para análise de anormalidades espermáticas. Obj. 100X.....	40
<b>Foto 7</b> Lâmina corada pelo método de Cerovsky. Obj. 100X.....	40
<b>Foto 8</b> Túbulos apresentando descamação de células germinativas, com um quadro típico de cariólise e picnose nuclear, além de acidofilia citoplasmática (necrose) (1). Além de presença de células germinativas vacuolizadas (2) H.E, 40X.....	54
<b>Foto 9</b> Túbulo epididimário apresentando preenchimento habitual por espermatozóide. Observa-se numerosas células espermatogênicas em necrose espermatócitos (1) e espermátides (2). Vacuolização de células epididimárias (3) H.E, 40X.....	54
<b>Foto 10</b> Túbulos seminíferos em geral com vacuolizações de células predominando nas células de Sertoli (1). As células germinativas consideravelmente reduzidas em número, as presentes são do tipo espermatogônia (2) e espermatócitos (3). H.E., 40X.....	55
<b>Foto 11</b> Ausência de espermatozoides no lume (1). Vacuolizações de células do epitélio epididimário (2) presença de corpos apoptóticos (3). H.E., 40X.....	55
<b>Foto 12</b> Túbulos seminíferos com atividade espermatogênica (1). Observa-se descamação de células no lume tubular (2). H.E, 40X.....	56
<b>Foto 13</b> Túbulos epididimário apresentando preenchimento habitual por espermatozoides (1). H.E, 20X.....	56

## LISTA DE GRÁFICOS

Página

- Gráfico 01** Valores médios de volume, pH, turbilhonamento e vigor durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 46
- Gráfico 02** Valores médios de motilidade e viabilidade espermática durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 46
- Gráfico 03** Valores médios de concentração espermática durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 47
- Gráfico 04** Valores médios de patologias com defeitos maiores (Subdesenvolvido-SUBD., Cauda fortemente dobrada-C.F.D, Gota citoplasmática proximal-G.C.P) durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 49
- Gráfico 05** Valores médios de defeitos menores (Cabeça isolada-CAB. ISOL., Desprendimento de acrossoma-DESP ACROSS., Cauda dobrada enrolada-C. DOB / ENROL) durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 50
- Gráfico 06** Representação das correlações entre motilidade (%) e viabilidade (%) do sêmen de touros bubalinos submetidos ao processo de insulação testicular no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 52
- Gráfico 07** Representação das correlações entre viabilidade (%) e defeitos totais (%) do sêmen de touros bubalinos submetidos ao processo de insulação testicular no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90))..... 52

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Medidas de circunferência escrotal e consistência testicular antes e após insulação em touros bubalinos submetidos a insulação testicular.....	43
<b>Tabela 2</b> Médias e erros padrão das temperaturas retal, do funículo e bolsa de insulação no período de insulação testicular de touros bubalinos.....	44
<b>Tabela 3</b> Médias e erros padrão de volume (ml), turbilhonamento, motilidade individual progressiva e vigor seminal de bubalinos com insulação testicular.....	45
<b>Tabela 4</b> Médias e erros padrão de concentração ( $\times 10^6/\text{ml}$ ), viabilidade (%) e pH seminal de bubalinos com insulação testicular.....	47
<b>Tabela 5</b> Médias e erros padrão dos parâmetros seminais de três touros bubalinos na propriedade 1.....	48
<b>Tabela 6</b> Médias e erros padrão dos parâmetros seminais de três touros bubalinos na propriedade 2.....	48
<b>Tabela 7</b> Médias e erros padrão nas fases de PI, I, P30, P60, P90 de defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e defeitos totais dos ejaculados dos animais insulados.....	48
<b>Tabela 8</b> Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos e morfológicos dos ejaculados de touros bubalinos submetidos ao processo de insulação testicular no estado do Pará.....	51

## SUMÁRIO

	Página
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b> 13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b> 16
2.1	OBJETIVO GERAL..... 16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b> 17
3.1	ANATOMIA DO ÓRGÃO GENITAL MASCULINO..... 17
3.2	PARÊNQUIMA TESTICULAR..... 17
3.3	CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN BUBALINO..... 18
3.4	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE DO SÊMEN..... 18
3.5	ESPERMATOGÊNESE..... 20
3.6	ESPERMIOGÊNESE..... 21
3.7	CICLO ESPERMATOGÊNICO..... 21
3.8	ONDAS ESPERMÁTICAS..... 21
3.9	MATURAÇÃO..... 22
3.10	CAPACITAÇÃO..... 22
3.11	CONTROLE ESPERMATOGÊNICO..... 23
3.12	MECANISMOS FISIOLÓGICOS RESPONSÁVEIS PELA TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR NO BOVINO..... 23
3.13	DEGENERAÇÃO TESTICULAR..... 25
3.14	OS EFEITOS DA TEMPERATURA NA ESPERMATOGÊNESE E NA ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR..... 25
3.15	EFEITO DA INSULAÇÃO TESTICULAR EM DIFERENTES ESPÉCIES RUMINANTES..... 28
3.16	CORRELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS..... 31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b> 34
4.1	LOCAL DE EXPERIMENTAÇÃO..... 34
4.2	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E MANEJO..... 35
<b>4.2.1</b>	<b>Exame Clínico Geral.....</b> 36
<b>4.2.2</b>	<b>Exame do Trato Genital.....</b> 36
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... 36
4.4	INSULAÇÃO TESTICULAR..... 36
4.5	COLHEITA E ANÁLISE DOS EJACULADOS..... 37
<b>4.5.1</b>	<b>Método de Cerovsky.....</b> 39

4.6	EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	41
<b>5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>43</b>
6.1	OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	43
6.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN.....	44
6.3	CORRELAÇÕES.....	50
6.4	RESULTADOS DO EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	53
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O búfalo doméstico pertence à família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, gênero *Bubalus bubalis*, sendo distinto do búfalo africano, *Syncerus caffer* e do búfalo americano *Bison bison*. Os bubalinos são ruminantes domésticos criados em todos os continentes, com maior concentração nos países tropicais e subtropicais (PERERA et al., 2005).

A população de bubalinos no mundo é estimada em mais de 177 milhões, com maior concentração na Índia, Paquistão e China (FAOSTAT, 2007). De acordo Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (A.B.C.B.) o rebanho bubalino brasileiro atinge hoje cerca de 3,5 milhões de animais e apresenta um crescimento anual de pelo menos 3 a 3,5% (BERNARDES, 2007), das quais a metade é criada na região amazônica, destacando-se a Ilha de Marajó, onde as raças Murrah, Mediterrânea, Jafarabadi, Carabao e o tipo Baio encontram-se cruzadas entre si, apresentando esta espécie, um crescimento anual superior aos dos bovinos (RIBEIRO, 1996; PERERA et al., 2005), também nas mesmas condições de manejo, os búfalos mostram taxa de fertilidade superior quando comparados aos bovinos (RIBEIRO, 1996; VALE, 2006).

Nos últimos anos, o interesse pelo búfalo no Brasil tem aumentado, devido ao reconhecimento de suas excepcionais características zootécnicas, como produtor de carne e de leite e como animal de trabalho. Apresenta um desempenho bem superior ao das outras espécies domésticas, mostrando grande capacidade de adaptação, principalmente em áreas considerada impróprias à pecuária bovina convencional, como as várzeas da região amazônica, com terras parciais ou totalmente inundáveis sazonalmente (PERERA et al., 2005).

Os bubalinos adaptaram-se bem à Região Norte, em razão da semelhança das condições ambientais locais com as de seus países de origem, caracterizadas pelo clima predominantemente tropical. Por isso, os bubalinos vêm sendo essenciais para a pecuária de corte e de leite no país, especialmente na região amazônica, onde, se encontra, cerca de 50% do rebanho bubalino brasileiro (CASSIANO et al., 2004).

Apesar da adaptabilidade às mais variadas condições ambientais, os búfalos possuem particularidades estruturais e funcionais específicas, como forte concentração de melanina na pele e no pêlo, baixa quantidade de glândulas sudoríparas, baixa densidade de pêlos e pele escura, sendo, portanto, especialmente sensíveis à radiação solar (HARVEY, 1963). Assim, os búfalos utilizam outros meios de aclimatação aos trópicos, como a via respiratória, com alta habilidade fisiológica para eliminar o excesso de calor (VILLARES, 1976).

Os testículos dos mamíferos encontram-se alojados no interior da bolsa escrotal e a temperatura testicular mantém-se entre 2 e 6°C, abaixo da temperatura corporal (WAITES, 1970; KASTELIC; COOK; COULTER, 1995), para que sejam produzidos espermatozóides férteis, necessitando para isso, numerosos mecanismos locais (MEIJER; FENTENER, 1993). Vários fatores contribuem para a termorregulação escroto-testicular, incluindo a estrutura penduncular do escroto e a vascularização testicular que, por meio do plexo pampiniforme, reduz a temperatura escrotal pela troca de calor entre o sangue circulante na artéria e na veia testicular (GUNN; GOULD, 1975; KASTELIC; COULTER, 1993; COOK; COULTER; KASTELIC, 1994). Em adição, a túnica dartos nos ruminantes altera a posição dos testículos em relação ao corpo em função da temperatura ambiente e as glândulas sudoríparas favorecem a evaporação diminuindo a temperatura escrotal (SETCHELL, 1998). Os testículos também apresentam funções básicas como a síntese de hormônios e a realização da espermatogênese. (BLAZQUEZ; MALLARD; WEDD, 1988).

Muitos experimentos têm mostrado o efeito da temperatura e função testicular ao encontrar o mecanismo através do qual o aumento da temperatura escrotal pode afetar a função testicular em touros (CASADY; MYERS; LEGATES, 1954; AUSTIN; HUPP; MURPHEE, 1961; GERONA; SIKES, 1970; ROSS; ENTWISTLE, 1979), em carneiros (MUCCIOLO; BARBABÉ; BARNABÉ, 1974) em suínos (STONE, 1982) e em coelhos (PLOEN, 1973). Contudo, o mecanismo é ainda desconhecido embora pareça ser causado pela hipóxia que acontece no testículo quando exposto a alta temperatura. Que segundo Voglmayr, Setchell e White (1970) pode também deprimir o metabolismo do espermatozóide no testículo.

Com a elevação da temperatura normal dos testículos, a espermatogênese sofre um efeito deletério, podendo ficar completamente reduzida, como é observado em animais criptorquídicos ou em indução experimental (GABALDI; WOLF, 2002). Segundo Lagerlof, (1938) que induziu experimentalmente a elevação da temperatura testicular, comprovou que houve aumento significativo das patologias espermáticas e isto passou a ser preocupação constante dos pesquisadores, principalmente após o grande aumento da utilização da inseminação artificial na atualidade.

Segundo Ohashi et al. (1988) em climas tropicais, a alta temperatura associada com a alta umidade tem mostrado ser um fator limitante para animais de clima temperado, já que a função reprodutiva é afetada resultando em infertilidade. Segundo os autores as raças da espécie *Bos indicus* são mais resistente ao estresse térmico quando comparada com raças da espécie *Bos taurus*.



Desde a primeira metade século passado já se produzia trabalhos visando o conhecimento dos problemas decorrentes ao aumento da temperatura testicular na qualidade de sêmen (GABALDI; WOLF, 2002).

A elevação da temperatura ambiental altera o mecanismo de termorregulação testicular acarretando degeneração que é a causa principal de sub-fertilidade e infertilidade em reprodutores (FONSECA; CHOW, 1995). A degeneração ocorre, principalmente, nos animais que vivem em condições climáticas desfavoráveis. O clima tropical, por apresentar altas temperaturas, facilita o aparecimento de alterações no epitélio seminífero, com conseqüentes efeitos na qualidade do sêmen (RAO; BANE, 1985). A recuperação do animal nestas condições depende da natureza e da duração do que está provocando o aumento dessa temperatura (FONSECA; CHOW, 1995).

Às altas temperaturas associadas com alta umidade são fatores limitantes em ambientes de trópicos para touros em reprodução, sendo a função reprodutiva afetada; resultando, em infertilidade (BARTH; BOWMAN, 1994). Estes autores também citam que, através do método da insulação térmica, envolvendo toda a superfície do escroto conseguiram eficiente indução da degeneração testicular prolongada e transitória, e que geralmente, leva a um quadro espermático de declínio da motilidade, vigor e concentração espermática e aumento das alterações morfológicas dos espermatozóides.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações morfo-funcionais dos testículos de bubalinos provocada pela insulação testicular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estado clínico andrológico dos búfalos submetidos à insulação testicular experimental;
- Determinar as características físicas e químicas do sêmen: volume, cor, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e pH;
- Determinar as características biológicas e de morfologia espermática como alterações de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda e, reação a coloração vital (eosina e nigrosina);
- Avaliar as modificações histológicas – testicular provocadas pela insulação.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ANATOMIA DO ÓRGÃO GENITAL MASCULINO

O sistema genital masculino do búfalo é muito semelhante ao do bovino. Algumas diferenças são observadas como no prepúcio, que não é muito pendulado, não formando a dobra triangular de pele na região abdominal, mas adere-se quase que totalmente, ficando apenas uma pequena parte de seis a dez centímetros livre. O pênis também é muito semelhante, porém um pouco menor que o do bovino (FISHER; BODHIPAKSHA, 1992).

A bolsa escrotal do búfalo não é tão pendulada e destacada quanto no bovino. Por isso o pequeno e limitado espaço inter-escrotal, faz com que muitas vezes, um dos testículos movimente-se para o pólo proximal ou caudal em relação ao outro causando uma aparência assimétrica do órgão (FISHER; BODHIPAKSHA, 1992; OHASHI, 2002). Os testículos, embora menores, são semelhantes aos dos bovinos e as glândulas vesiculares e ampolas são pequenas e podem ser palpadas pelo exame retal como realizado em bovinos (FISHER; BODHIPAKSHA, 1992).

#### 3.2 PARÊNQUIMA TESTICULAR

O parênquima testicular consiste de túbulos seminíferos e tecido intersticial (JOHNSON, 1991). O testículo é cercado por uma cápsula denominada túnica (O'DONNEL et al, 2001).

Os espermatozóides são produzidos através da espermatogênese dentro dos túbulos seminíferos (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). Estes são compostos por células espermatogênicas: espermatogônia, espermatócitos e espermátides entremeados por células de suporte, as células de Sertoli (DADOUNE; DEMOULIN, 1993).

As várias gerações de espermatogônias não são aleatoriamente dispostas dentro dos túbulos seminíferos, mas são organizados em associações celulares estritamente definidas (O'DONNEL et al., 2001) e seu desenvolvimento conta com uma íntima associação com as células de Sertoli, com múltiplos tipos de espermatogônias em contato com uma única célula de Sertoli (O'DONNEL et al., 2001).

Quando o desenvolvimento das células germinativas se completa, as espermátides maduras são liberadas pelas células de Sertoli dentro do lúmen, e passam por um sistema de ducto coletor, conhecido como *rete testis*, antes de entrarem no epidídimo via ductos eferentes. Durante a passagem através do epidídimo, as espermátides sofrem uma série de alterações bioquímicas para se tornarem espermatozóides móveis capazes de fertilizar (O'DONNEL et al., 2001). As secreções das glândulas acessórias: vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e próstata provêm nutrientes para os espermatozóides (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

### 3.3 CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN BUBALINO

No búfalo o ejaculado normal apresenta uma coloração branco-leitoso a acinzentado, raramente ultrapassa 5 mL e possui uma concentração espermática entre 300 e 1.500 milhões de células por mL (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). Segundo Vale (2002), um ejaculado bubalino de boa qualidade apresenta volume que varia de 1,0 a mais de 3,0 mL, concentração espermática de 600 a 1.200 milhões de espermatozóides por mL, turbilhonamento mínimo de 3 (escala de 0 a 5), motilidade espermática entre 60 e 80%, vigor de pelo menos 3 (escala de 0 a 5) e pH entre 6,5 e 7,2. Já Aguiar et al. (1996), em seus estudos encontraram um pH de  $6,86 \pm 0,35$ , corroborando com o autor supracitado. Barnabe (1999) cita que os padrões mínimos para a classificação de uma amostra “provavelmente fértil” de sêmen de búfalo são: 500 milhões de espermatozóides por mL, mais de 60% de espermatozóides móveis com progressão retilínea e mais de 70% de espermatozóides com morfologia normal.

### 3.4 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE DO SÊMEN

Em búfalos adultos, existe uma variação da qualidade seminal em função da época do ano, o que pode ser atribuído, principalmente, a um efeito das temperaturas do ambiente sobre o animal e, conseqüentemente, sobre a espermatogênese (GARCIA, 2006). Segundo Gangwar (1980), durante os meses de verão, a porcentagem de espermatozóides vivos em ejaculados de búfalos adultos é de  $64,6 \pm 4,4\%$ , deliberadamente inferior aos dados alcançados no outono, inverno e primavera, quando se obtêm valores de  $90,5 \pm 0,8\%$ ,  $84,5 \pm 2,3\%$  e  $95,7 \pm 1,5\%$ , respectivamente.

O efeito negativo da temperatura ambiente sobre a qualidade seminal pode ser resultante da indução de degeneração testicular. Essa patologia é ocasionada, entre muitos

fatores, por qualquer processo que determine a elevação da temperatura dos testículos, como, por exemplo, a dermatite escrotal, o excesso de gordura escrotal, edema, periorquite e elevação da temperatura ambiente com conseqüente estresse térmico (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Segundo Skinner e Louw (1966), a temperatura ambiente crítica para prejuízo da espermatogênese está entre 27°C e 32°C, e exposições contínuas a temperaturas excedendo os 30°C podem determinar marcante efeito negativo sobre a produção espermática em animais da espécie bovina.

Os ejaculados de machos com degeneração testicular de média intensidade apresentam baixa concentração espermática, baixa motilidade e número moderado de células com defeitos morfológicos, como gotas protoplasmáticas proximais, diadema, vacúolos e outros defeitos nucleares (WENKOFF, 1988). Em casos mais severos, além da oligozoospermia e da astenozoospermia, pode ser detectado também aumento no número de espermatozóides com anomalias morfológicas, especialmente com defeitos de peça intermediária e de cabeça. A presença de células primordiais da linhagem espermatogênica, células gigantes, medusas ou células germinativas multinucleadas no ejaculado indica danos severos ao epitélio seminífero (VAN CAMP, 1997; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). A presença de espermatozóides com formas teratológicas em grande quantidade no ejaculado é um indicativo de espermatogênese severamente prejudicada (JOHNSON et al, 1997).

Apesar da termorregulação escrotal ser um fenômeno complexo que depende, entre outros fatores, da temperatura e umidade ambiental, da temperatura corporal, da postura do animal, da variação anatômica escrotal e da condição corporal do animal, o escroto tem alguns importantes mecanismos que facilitam sua termorregulação. Sua posição extracavitária e pendular facilita a dissipação do calor e permite que os testículos sejam afastados da cavidade abdominal (GARCIA, 2006). De acordo com os estudos de Burfening e Ulberg, (1968); Vale et al. (2008) sabe-se que machos que passaram por estresse térmico testicular com conseqüente quadro de degeneração testicular leve a moderada, mesmo após o retorno da espermatogênese à normalidade produzem espermatozóides com baixo potencial fertilizante e maior incidência de mortalidade embrionária.

Apesar do declínio da qualidade seminal decorrentes de altas temperaturas serem bem descritas na literatura, essas variações não foram reproduzidas em testes de câmara climática por Chacur, Oba e Ramos (2001). Os autores descreveram que touros bubalinos, quando mantidos em câmara climática com temperatura do ar em 39° C por 9 horas diárias, durante 54 dias, não apresentaram diferenças significativas dos animais controle em relação a cor, motilidade, concentração e porcentagem de patologias espermáticas. Segundo estes

autores foram encontradas diferença apenas no volume do ejaculado, sendo este menor para os animais que sofreram estresse térmico. Portanto concluíram que a alta temperatura aplicada durante os 54 dias de estudo não afetou a espermatogênese dos animais.

O manejo diferenciado de touros bubalinos pode ser uma estratégia interessante para preservar a produção e a qualidade seminal de búfalos criados na Amazônia, principalmente para animais considerados de elite (GARCIA, 2006). Coimbra (2002) avaliou as características seminais de doadores de sêmen zebuínos, taurinos e bubalinos, mantidos em central de inseminação artificial no Estado do Pará, no trópico úmido brasileiro. A fim de realizar a comparação, foram agrupados os dados de seis anos consecutivos sobre os ejaculados coletados durante a estação mais chuvosa do ano (janeiro a junho) e durante a estação menos chuvosa (julho a dezembro). O autor concluiu que os touros bubalinos apresentaram diferenças na qualidade seminal, sempre favorável aos ejaculados produzidos no período mais chuvoso do ano e que a motilidade espermática foi o atributo que apresentou diferenças, tanto no sêmen *in natura*, quanto após a diluição e após a descongelação. O autor não observou diferenças entre estações para as características de volume seminal, concentração espermática, turbilhonamento, vigor e defeitos espermáticos (maiores, menores e totais).

Neste estudo de Coimbra (2002), os dados obtidos com animais alojados em centrais de inseminação artificial não devem ser extrapolados para animais mantidos a campo, em virtude das evidentes diferenças de manejo às quais estes estão sujeitos, e porque os animais a campo permanecem expostos ao ambiente de modo mais intenso.

### 3.5 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo que ocorre nos túbulos seminíferos do testículo, onde as células germinativas entram em divisão, diferenciação, e se transformam nos espermatozoides (JOHNSON et al., 1997). A duração desse processo é de aproximadamente 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos estudados (JOHNSON, 1991). De acordo com Janakiraman (1988) os bubalinos possuem o mais curto ciclo espermatogênico dentre os animais domésticos com duração de apenas 38 dias.

### 3.6 ESPERMIOGÊNESE

A espermiogênese é a transformação de espermátides arredondadas na complexa estrutura do espermatozóide (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). Esta inicia-se nos túbulos seminíferos e termina no epidídimo (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

As espermátides produzidas pela segunda divisão meiótica se diferenciam da forma celular esférica com núcleo esférico para células que têm uma cabeça aerodinâmica contendo enzimas que possibilitam a penetração no oócito, núcleo condensado que carrega o genoma masculino, as mitocôndrias bem desenvolvidas para fornecer energia e uma cauda necessária para motilidade celular. (JOHNSON, 1991; O'DONNEL et al., 2001).

### 3.7 CICLO ESPERMATOGÊNICO

O ciclo espermatogênico para várias espécies são os seguintes: porco, 8 dias (STANBENFELD; EDQVIST, 1996); ovino, 10 dias (GARNER; HAFEZ, 1982; STANBENFELD; EDQVIST, 1996); bovino, 14 dias (STANBENFELD; EDQVIST, 1996); rato, 12 dias; humano, 16 dias (JOHNSON, 1991; STANBENFELD; EDQVIST, 1996); cavalo, 12 dias (GARNER; HAFEZ, 1982; JOHNSON, 1991); Beagle, 14 dias e hamster 9 dias (JOHNSON, 1991).

Há uma relação bastante precisa entre a duração do ciclo espermatogênico e a espermatogênese, isto é, a espermatogênese é aproximadamente quatro a cinco vezes a duração do ciclo espermatogênico (JOHNSON, 1991; STANBENFELD; EDQVIST, 1996). Por exemplo, um touro tem ciclo espermatogênico de 14 dias, a proliferação mitótica requer cerca de um ciclo, divisão meiótica requer dois ciclos e a espermiogênese requer 22 a 23 dias antes que o esperma seja liberado para o lúmen dos túbulos seminíferos (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

### 3.8 ONDAS ESPERMÁTICAS

A onda espermática é espacial e corresponde a uma ordem seqüencial de estágios ao longo da extensão dos túbulos seminíferos a uma determinada hora. A origem da onda é incerta, mas resulta de divisão sincronizada, mas não simultânea de espermatogônias em segmentos tubulares adjacentes ao longo dos túbulos seminíferos (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

Essa onda espermatogênica pode funcionar como um mecanismo para assegurar a liberação constante de espermatozóide, reduzir a competição por hormônios e metabólitos usados em dado estágio, reduzir a congestão tubular que pode ser produzido por espermição, que ocorre simultaneamente ao longo de toda a extensão do túbulo, assegurar a constante liberação de fluido do túbulo seminífero para manter o transporte dos espermatozóides e hormônios necessários pelo epitélio do epidídimo e facilitar a maturação de espermatozóide pelo epidídimo por constante liberação de espermatozóide e fluido da espermátide, na espécie bovina (JOHNSON, 1991).

### 3.9 MATURAÇÃO

Durante a passagem no epidídimo, o desenvolvimento da habilidade fertilizante está relacionado com modificações em vários aspectos da integridade funcional dos espermatozóides: desenvolvimento do potencial para manter a motilidade progressiva, alteração dos padrões metabólicos e a situação estrutural de específicas organelas da cauda, modificações na cromatina nuclear, modificações na natureza da superfície de membrana plasmática e, movimentação e perda da gota protoplasmática. O principal local de armazenamento de espermatozóides do trato reprodutivo masculino é a cauda do epidídimo, que apresenta 70% do número total de espermatozóides (GARNER; HAFEZ, 2004).

### 3.10 CAPACITAÇÃO

A capacidade fertilizante do espermatozóide após passar pelo epidídimo é considerada potencial, pois eles devem sofrer a capacitação no trato reprodutivo feminino antes que possam penetrar nos óvulos (GARNER; HAFEZ, 1982). A capacitação pode ocorrer tanto no útero como no oviduto, mas o espermatozóide é mais prontamente capacitado se exposto a ambos ambientes. Em geral, os estrógenos mediam mudanças no trato feminino que tem efeito estimulatório na capacitação, enquanto a progesterona pode inibir a capacitação (ANDERSON, 1991).

Um número de mudanças inclusive metabólicas são descritas associadas à capacitação, uma delas relacionada à mudança no padrão de motilidade levando a hiperativação. A capacitação também envolve mudanças na membrana plasmática que cobre a porção anterior da cabeça espermática, permitindo assim a ocorrência do fenômeno de reação acrossômica (ANDERSON, 1991).



### 3.11 CONTROLE ESPERMATOGÊNICO

Existe uma série de interações complexas locais entre as células de Sertoli e células germinativas; as células germinativas e peritubulares e, células de Sertoli e de Leydig. Essas interações servem para dois propósitos: coordenar as funções dos três compartimentos testiculares: túbulos seminíferos, interstício e vasos e controle de uma complexa, mas ordenada, seqüência de eventos que constituem o ciclo espermatogênico (SHARPEL, 1986).

A regulação da espermatogênese envolve tanto mecanismos endócrinos como parácrinos. A estimulação endócrina envolve o hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), e uma ação através da testosterona, produzida pelas células de Leydig (KRETZER et al., 1998).

### 3.12 MECANISMOS FISIOLÓGICOS RESPONSÁVEIS PELA TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR NO BOVINO

No touro, o escroto exerce uma importante função na manutenção da temperatura testicular. Os testículos devem ser mantidos entre 2 a 6°C, abaixo da temperatura corporal para que a produção de espermatozóides (espermatogênese) e de testosterona (esteroidogênese) não seja prejudicada (KASTELIC; COULTER, 1993).

A manutenção térmica da pele escrotal é afetada pela temperatura ambiental, umidade, temperatura corporal, quantidade de calor perdida por radiação do escroto, postura do animal, variação anatômica na forma (escroto com funículo espermático curto, escroto pequeno), grau de obesidade do animal (excesso de gordura no subcutâneo escrotal e funículo espermático) e integridade do escroto como ausência de hiperexia, edema e traumatismos (GABALDI; WOLF, 2002).

A termorregulação testículo-escrotal é um fenômeno complexo onde numerosos mecanismos locais desempenham um importante papel. O cone vascular, formado pelas veias do plexo pampiniforme circundando a artéria testicular, permite a troca contracorrente de calor, a regulação do fluxo sanguíneo e a perda de calor por irradiação (KASTELIC; COULTER, 1993).

O escroto penduloso aumenta a área de superfície que facilita a exposição do cone vascular ao meio ambiente e permite que os testículos fiquem distantes do corpo do animal. A pele escrotal é fina, pobre em gordura subcutânea e relativamente sem pêlos; contando ainda

com os sistemas sangüíneo e linfático bem desenvolvido, facilitando a perda térmica por irradiação e evaporação (GABALDI; WOLF, 2002).

A sudorese é uma forma de perda de calor importante dada pelo escroto, graças a grande quantidade de glândulas sudoríparas presentes. O músculo cremáster e a túnica dartus, cuja ação é comandada por nervos simpáticos lombares, relaxam e contraem, afastando ou aproximando os testículos da área inguino-abdominal, posicionando-os em resposta a temperatura do meio ambiente, o que facilita a preservação do gradiente de temperatura abdomino-testicular (KASTELIC; COULTER, 1993).

A organização geral do suprimento sangüíneo dos órgãos genitais masculinos torna-se essencial para a termorregulação, sendo espécie específica, ocorrendo variações individuais. Uma disposição especial existe no touro entre a artéria e a veia testicular. No curso distal do cordão espermático, a artéria testicular começa enovelar-se fortemente, sendo circundada por uma fina rede da veia testicular. Esta malha venosa, também chamada de plexo pampiniforme, proporciona uma grande superfície de contato e um sistema de trocas térmicas contracorrentes entre artéria e veia. As trocas de calor ocorram neste local, entre o sangue arterial quente com o sangue venoso frio, auxiliando na manutenção da temperatura testicular menor que a corporal. Esta troca de calor depende muito da diferença de temperatura entre artéria e veia, ou seja, da temperatura corporal e do testículo, respectivamente (WAITES; SETCHELL, 1990).

Numerosas anastomoses arteriovenosas estão presentes entre a artéria testicular enovelada, seus ramos epididimais e as veias do plexo pampiniforme, proporcionando um meio para diminuir o fluxo de sangue arterial para o testículo. Acredita-se que apenas 50% do sangue que chega pela artéria testicular irriga os testículos, trabalhando em estado de hipóxia. O significado fisiológico desta notável conformação ainda não é totalmente entendido, mas provavelmente constitui uma regulação potencial do suprimento sangüíneo, do controle hormonal e da função de termorregulação (WAITES; SETCHELL, 1990).

Os touros zebuínos apresentam uma superfície de pele mais extensa e com maior número de glândulas sudoríparas, além de uma termogênese menor que os taurinos, características que permitem aos zebuínos ter uma melhor termorregulação, tornando-os mais resistentes ao estresse térmico. Diferenças individuais na área da superfície corporal, no número de glândulas sudoríparas, na característica do escroto, do cone vascular e na termogênese podem determinar essa desigualdade entre os animais, influenciando na susceptibilidade ao calor, denominando um touro termo-sensível ou termo-resistente (ENTWISTLE, 1992).

### 3.13 DEGENERACÃO TESTICULAR

A degeneração testicular constitui a principal causa de redução da fertilidade nos machos (NASCIMENTO; SANTOS, 1997), sendo mais encontrada nos touros de origem européia do que nos zebuínos (VALE FILHO et al., 1979). É uma alteração adquirida, uni ou bilateral, temporária ou permanente e sua gravidade depende do tipo, severidade e duração do insulto (SETCHELL, 1998). Pode ser causada por distúrbios de saúde, principalmente, quando acompanhados de febre, toxemia ou infecção local, assim como outras alterações que elevem a temperatura testicular, tais como: infecções ou traumas, lesões vasculares, varicocele, dermatite ou excesso de gordura escrotal, edema e hidrocele. Além disso, fatores auto-ímmunes, obstrução da cabeça do epidídimo, agentes químicos, físicos e fatores hormonais também predisõem a degeneração testicular (NASCIMENTO; SANTOS, 1997).

Mesmo quando o estado geral do animal e a libido são normais, os testículos podem apresentar consistência e volume alterados. Inicialmente, a consistência é flácida e, se não removida a causa, a degeneração torna-se crônica com redução do tamanho testicular podendo progredir para atrofia, tornando-se fibroso e mais firme à palpação, nestes casos distúrbio total na espermatogênese pode ser observado (VAN CAMP, 1997).

Na degeneração leve ou moderada, há possibilidade de recuperação completa da função testicular, pois as espermatogônias tronco, células de Sertoli e de Leydig possuem resistência relativa, permitindo o restabelecimento da espermatogênese por volta de 60 dias após a remoção do agente causal (LAGERLOF, 1938; NASCIMENTO; SANTOS, 1997). De acordo com Van Camp (1997), estabelecer um diagnóstico e prognóstico seguros para degeneração testicular depende da realização detalhada da anamnese, exame clínico geral e andrológico, com avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen em exames consecutivos, visando evitar o descarte de touros com base em apenas uma avaliação, pois estes, uma vez recuperados, readquirem a fertilidade normal.

### 3.14 OS EFEITOS DA TEMPERATURA NA ESPERMATOGÊNESE E NA ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR

Durante os meses mais quentes do ano, os bovinos apresentam uma redução na performance reprodutiva devido ao estresse térmico. Em situações de temperatura ambiente elevada, a temperatura corporal é mantida pelo aumento da vasodilatação periférica, da sudorese e da frequência respiratória, permitindo a perda de calor corporal (GABALDI;

WOLF, 2002). No entanto, os mecanismos fisiológicos da termorregulação são limitados e quando não suficientes, resultam em hipertermia causando estresse térmico. A consequência da exposição dos testículos a altas temperaturas ambientais é a redução da libido, da qualidade seminal e da fertilidade (FONSECA; CHOW, 1995).

O aumento da temperatura nos testículos causa a degeneração testicular, alterando suas funções de espermatogênese e esteroidogênese (GABALDI; WOLF, 2002).

A hipertermia testicular pode causar a aspermia, aumento da taxa de mutações e alterar a espermatogênese e a formação do gameta, podendo levar a infertilidade e esterilidade do touro (BLANCHARD et al., 1992).

As primeiras consequências do efeito do calor no bovino são observadas com a alteração da fertilidade. Ao exame clínico externo, mudanças anatômicas dos testículos ocorrem no tamanho, no peso e na textura. Segundo Rhines e Ewing (1973) o aumento da temperatura ocasiona efeitos fisiológicos e metabólicos, incluindo mudanças no fluxo sanguíneo e linfático, tensão de oxigênio, fluídos testiculares, vias metabólicas específicas e do sistema enzimático. Estas alterações afetam também o estado endocrinológico, comprometendo a produção de testosterona e, conseqüentemente, a sua ação no trato reprodutivo (RHINES; EWING, 1973; GABALDI; WOLF, 2002).

As altas temperaturas nos testículos reduzem a qualidade do sêmen produzido, ocasionando o aumento das patologias espermáticas e a diminuição da motilidade, do vigor e de espermatozoides vivos, devido à depressão da espermatogênese vista nos touros. Além disso, pode apresentar redução do volume do ejaculado e alteração da concentração espermática (FONSECA; CHOW, 1995).

As elevações de temperatura produzem espermatozoides anormais, pois afetam etapas da espermatogênese, principalmente na fase intermediária (espermatócitos e espermátides) e com menos intensidade, na etapa inicial (espermatogônia) e na final (espermatozoides). Os espermatócitos e as espermátides são muito termo-sensíveis, e quando alteradas, prejudicam a qualidade do sêmen. Já os espermatozoides maduros parecem ser afetados durante o estágio final de desenvolvimento na região da cabeça do epidídimo, ocorrendo alterações estruturais e metabólicas; este gameta pode fertilizar, mas ocorre a morte embrionária conseqüente (ENTWISTLE, 1992).

As patologias espermáticas características do ejaculado em uma degeneração testicular são a presença de células descamativas, de espermátides, núcleos picnóticos e formação de células gigantes e medusas. Há alta incidência de anomalias de cabeça, como

piriforme, estreita na base, subdesenvolvida, contorno anormal e pequena, patologias de acrossomo, de cauda e gota citoplasmática proximal e distal (RAO; BANE, 1985).

As células de Leydig e de Sertoli parecem ser mais resistentes ao calor, enquanto que as células germinativas são as mais termo-sensíveis do testículo. Todos os estágios são susceptíveis ao calor, com o grau de lesão dependendo da extensão e duração do insulto térmico. A regeneração da função espermática após o dano do calor depende da divisão contínua da espermatogônia (BARTH; BOWMAN, 1994; SHETCHELL, 2006).

A gravidade da degeneração testicular é dependente do tempo e da temperatura de exposição, mas mesmo um aumento térmico de 1 ou 2° C por 8 horas pode causar grandes alterações na espermatogênese (SETCHELL, 1998).

A degeneração testicular pode ser temporária ou permanente; porém, sua dimensão depende do tipo, severidade e duração do insulto térmico (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Segundo Setchell (1998), a morfologia espermática retorna aos valores obtidos no pré-tratamento com aproximadamente seis semanas após o insulto térmico. Injúrias térmicas severas no testículo, ou por período muito prolongado, provocam um retardo na recuperação do mesmo. Entretanto, mesmo após a morfologia da célula retornar ao estágio normal, o sêmen apresenta baixa capacidade de fertilização e há um aumento na incidência de morte embrionária (SETCHELL, 1998).

A exposição do animal a elevadas temperaturas por um período maior de tempo causa redução nas concentrações plasmáticas de testosterona, ocorrendo um aumento deste hormônio após um período curto de adaptação (GABALDI, 2000).

A degeneração do epitélio seminífero pode ser causada rapidamente e, se o processo não for muito prolongado, a recuperação completa pode ocorrer em um período curto de tempo. A regeneração do epitélio germinativo é possível e dependerá da sobrevivência das espermatogônias e das células de Sertoli. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar nos testículos um quadro de fibrose irreversível. Nos insultos severos em que a espermatogônia é atingida pode ocorrer a azoospermia (THOMSON, 1990; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Segundo Thomson (1990) a fase regenerativa é marcada por uma recuperação da concentração, motilidade, vigor e espermatozóides morfologicamente normais, que apesar da desorganização do epitélio germinativo durante a fase de degeneração, demonstra uma grande capacidade de recuperação devido à resistência das espermatogônias e células de Sertoli.

### 3.15 EFEITO DA INSULAÇÃO TESTICULAR EM DIFERENTES ESPÉCIES RUMINANTES

O desempenho reprodutivo dos ruminantes domésticos é influenciado pela adaptação deles ao meio ambiente em que são explorados. Entre os fatores ambientais, a temperatura e a umidade relativa do ar exercem papel importante sobre a reprodução, especialmente de animais importados para região edafoclimática diferente daquela de origem (CHEMINEAU, 1986). Também parâmetros como genótipo, estação do ano, idade, nutrição, perímetro escrotal e sistema de manejo devem ser considerados quando se avalia a capacidade reprodutiva do macho, pertencente à espécie caprina. (SIMPLÍCIO et al., 1988; EL-SHARABASSY et al., 1990; MAIA; VIEIRA, 1992; ROCA et al., 1992; VILAR FILHO et al., 1993a).

A espermatogênese está sob o controle fisiológico do sistema neuroendócrino e sofre influência direta da termorregulação escroto-testicular (COUROT; ORTAVANT, 1981; BYERS; GLOVER, 1984).

Nos mamíferos, com testículos localizados permanentemente na bolsa escrotal, a termorregulação acontece principalmente pela existência de três mecanismos: as glândulas apócrinas, situadas na bolsa escrotal, permitem a sudação com subsequente resfriamento testicular; a túnica dartos e o músculo cremáster que favorecem o afastamento e a aproximação dos testículos à região inguino-abdominal e o plexo pampiniforme, constituído por artérias e veias testiculares, dispostas contiguamente, o qual é responsável pela troca de calor e conseqüente resfriamento do sangue arterial (VILLARES, 1976).

O aumento da temperatura do escroto, natural ou induzido pela insulação da bolsa escrotal, interfere na termorregulação testicular, predispondo à degeneração do epitélio germinativo gonadal. Esse aumento de temperatura leva a sérias conseqüências para a qualidade do sêmen e conseqüentemente para a fecundação e a sobrevivência embrionária, interferindo diretamente sobre os resultados de fertilidade (MUCCILO; BARBABÉ; BARNABÉ, 1974; MIEUSSET et al., 1992).

Existe uma forte correspondência entre as medidas escroto-testiculares e o desenvolvimento ponderal, que em associação com a idade fornecem subsídios para a seleção de indivíduos destinados à reprodução. Dentro de uma mesma raça e faixa etária, os machos portadores de um maior perímetro escrotal devem ser selecionados em detrimento daqueles com perímetro reduzido, pois estes poderão ser portadores, entre outras alterações, da hipoplasia testicular. Também alguns autores ressaltam, a importância da consistência

testicular na avaliação clínico-andrológica e produção espermática nos ruminantes (VILAR FILHO et al., 1993b; SIMPLÍCIO et al, 1988).

Santos e Simplício (2000) estudaram a insulação escroto-testicular em animais da espécie caprina e observaram alterações na qualidade do sêmen e nas medidas escroto-testiculares em todos os animais, independentemente do genótipo, variando de intensidade entre os indivíduos. Estes autores ressaltam que a degeneração seminal ocorreu mais rapidamente nos animais MOPA (½ sangue Moxotó-Pardo Alpina), por tratar-se de animais com sangue de origem de uma região edafoclimática, diferente dos trópicos. Parâmetros como o volume apresentaram comportamento atípico durante todo o período experimental, não representando um bom parâmetro para avaliar os efeitos do desafio térmico escroto-testicular.

A concentração, a motilidade individual progressiva (MIP) e o vigor espermático também mostraram variações uma semana após o início da insulação, mostrando-se amplamente alterados, independentemente do genótipo, indicando uma interferência do aumento da temperatura escroto-testicular e da termorregulação sobre a espermatogênese. Houve diminuição da concentração espermática e uma acentuada redução da MIP e do vigor espermático duas semanas após iniciada a insulação da bolsa escrotal, além de aumento das patologias espermáticas, o qual culminou com um quadro de necrospermia (SANTOS; SIMPLÍCIO, 2000).

De acordo com os autores citados anteriormente o pico da degeneração seminal ocorre duas semanas após o início da insulação escroto-testicular, independente dos genótipos, evidenciando claramente a importância da termorregulação escroto-testicular, mesmo em animais adaptados ao meio ambiente, para a qualidade quanti-qualitativa do ejaculado.

Moreira, Moura e Araújo (2001) demonstraram que o aumento da temperatura escrotal, pode ter provocado alguma reabsorção de espermatozoides anormais no epidídimo, causando assim uma pequena redução na concentração de células no ejaculado, sendo observado na primeira coleta após a retirada da bolsa de insulação. Rao, Bane e Gustafsson (1980) em estudos realizados demonstraram que, em touros, há reabsorção de espermatozoides com defeitos morfológicos no epidídimo e ductos eferentes.

Alterações na circunferência escrotal também evidenciam que o estresse térmico causa diminuição na população de células germinativas nos túbulos seminíferos. Medidas testiculares estão associadas com a produção espermática diária em carneiros, número de espermátides por célula de Sertoli e área dos túbulos seminíferos, além de apresentarem

relação inversa com a taxa de degeneração de células germinativas em touros (MOREIRA; MOURA; ARAÚJO, 2001).

A diminuição na consistência do parênquima testicular está associada a uma redução na produção de espermatozóides (SIMPLÍCIO et al., 1988) e maior número de espermátocitos e espermátides degeneradas em todos os estágios do ciclo da espermatogênese em touros (MOREIRA; MOURA; ARAÚJO, 2001).

Pezzini et al. (2006), em revisão sobre aspectos reprodutivos em touros Holandeses e Curraleiros nos trópicos, salientam a importância da variação sazonal sobre a concentração espermática e a porcentagem de espermatozóides com defeitos morfológicos, indicando que a baixa qualidade do sêmen, em alguns animais, pode ocorrer em razão do desconforto causado por temperaturas ambientais elevadas.

Fonseca, Vale Filho e Mies Filho (1992), ao estudar a raça Nelore, também concluíram que a qualidade do sêmen pode ser afetada significativamente pelo ambiente, por meio de flutuações na temperatura, umidade e foto-período. Santos e Simplício (2000) através de estudos realizados afirmam que existem diferenças entre o comportamento reprodutivo das raças naturalizadas brasileiras, quando comparadas a raças comerciais. Entre as formas de se avaliar a eficiência reprodutiva de uma raça em determinado ambiente específico, a insulação escrotal por curtos períodos mostra-se como uma opção na avaliação reprodutiva de touros em climas quentes.

No experimento realizado por Pezzini et al. (2006) a insulação escrotal causou uma redução significativa na motilidade espermática, a partir do quinto e nono dias após a aplicação da bolsa térmica nos touros Holandeses e Curraleiros, respectivamente. Estes autores acreditam que o efeito do aumento da temperatura, na bolsa escrotal, tenha se evidenciado primeiramente no epidídimo, interferindo no processo de maturação da célula espermática.

Nos touros Holandeses, as espermátides foram afetadas também durante a espermatocitogênese, enquanto na raça Curraleira, aparentemente, somente as espermátides em fase de maturação foram afetadas pela insulação escrotal (PEZZINI et al., 2006).

Estes resultados evidenciaram uma maior ou menor adaptação dos animais ao meio tropical, sendo semelhantes aos resultados descritos por Troncoso (1997) e Garcia (2004) quando avaliaram a qualidade de sêmen de touros Simental, em relação à tolerância ao calor.

As células germinativas testiculares apresentam diferentes graus de sensibilidade à elevação de temperatura escrotal. Os espermátocitos e espermátides são particularmente sensíveis, enquanto que, as espermatogônias, são mais resistentes (SETCHELL, 1998).



BARTH; OKO (1989), PEZZINI et al. (2006) observaram que após a insulação escrotal, mudanças na produção e qualidade espermática ocorreram depois de um intervalo de tempo determinado, que varia de acordo com o estágio de desenvolvimento das células germinativas afetadas no momento da insulação escrotal.

De acordo com Pezzini et al. (2006), variações significativas também foram observadas na avaliação da morfologia espermática, em todos os parâmetros mensurados. Houve diferença no percentual de espermatozoides anormais, quando foram comparadas às duas raças estudadas. Os touros da raça Curraleira apresentaram, ao redor do 16º dia após a insulação escrotal, valores máximos de espermatozoides anormais no ejaculado. Na raça Holandesa, no entanto, permaneceu acima de 30% de anormalidades espermáticas, entre o 16º e 44º dia após a insulação.

Com relação ao mecanismo de insulação escrotal levando à formação de espermatozoides anormais Setchell (1998) sugere que o aumento de temperatura testicular resulta num incremento do metabolismo e demanda de oxigênio, de tal forma que a vascularização sanguínea testicular não consegue neutralizá-la, levando à hipóxia e formação de um oxigênio reativo e, conseqüentemente, à formação de anormalidades espermáticas.

Pezzini et al. (2006) observaram que existe uma predisposição genética para o desenvolvimento de alterações morfológicas espermáticas específicas, em resposta às condições adversas como o aumento da temperatura testicular.

### 3.16 CORRELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS

Vasconcelos (2001) observou valores de correlação de Pearson (fenotípicas) entre perímetro – escrotal (PE) e parâmetros reprodutivos. As correlações encontradas foram, geralmente, favoráveis, porém de baixa magnitude entre PE e características físicas e morfológicas do sêmen e destas entre si. No entanto, foram registrados altos valores de correlação das características morfológicas com as classes andrológicas, demonstrando a importância dessas características na classificação dos touros.

Coe e Gibson (1993) observaram, em animais jovens de origem européia, que perímetro escrotal ajustado aos 200 dias de idade está positivamente correlacionado com perímetro escrotal aos 365 dias de idade. Os autores verificaram que a medida do perímetro escrotal aos 200 dias de idade corresponde a, aproximadamente, 50% do tamanho do perímetro escrotal aos 365 dias de idade.

Alta correlação entre a idade e peso corporal com o PE já foi descrita em búfalos de rio ( $2n = 50$ ) por Vale et al. (2001) em búfalos de pântano ( $2n=48$ ) por Bongso, Hassan e Nordin (1984) e McCool, Entwistle e Gilham (1985).

Vasconcelos (2001) observou elevadas correlações de Pearson entre características de biometria e volume testicular. Entretanto, o formato testicular não apresentou correlação com as características físicas e morfológicas do ejaculado ou com o perímetro escrotal, e somente se correlacionou com as características biométricas dos testículos.

Paneto et al. (2002) relataram correlações genéticas positivas entre ganho de peso e ganho de perímetro escrotal (0,18). Ortiz Peña, Queiroz e Fries (2001) concluíram que a seleção do perímetro escrotal corrigido para idade e peso do animal (PEip) traria menor resposta para velocidade de crescimento quando comparada à praticada pelo perímetro escrotal corrigido apenas pela idade (PEi) ou pelo perímetro escrotal observado (PE). Estas observações corroboram com o estudo de Everling et al. (2001), no qual verificaram que a seleção direta para perímetro escrotal, ajustada para idade e peso, não traria resposta correlacionada para ganho médio diário, principalmente na fase de pré-desmama.

Bourdon e Brinks (1986), Lunstra, Ford e Echterkamp (1988) e Smith, Brinks e Richardson (1989b) descrevem que as correlações genéticas e fenotípicas entre características testiculares e de crescimento em touros de 12 meses foram, geralmente, positivas.

Ohashi et al. (2007) observaram que os dados biométricos relacionados ao peso corporal e circunferência escrotal em bubalinos apresentaram alta correlação, quando comparados aos dados citados na literatura para bovinos taurinos. O mesmo foi observado em relação ao processo espermatogênico, sendo que, aos 24 meses, os animais já se encontravam aptos à reprodução, mesmo sem terem atingido a capacidade máxima de produção seminal.

Correlações genéticas favoráveis entre perímetro escrotal aos 12 meses de idade e data do primeiro parto (-0,18) e desfavoráveis entre perímetro escrotal aos 18 meses de idade e data do primeiro parto (0,21), foram observadas por Gressler (1998) indicando que a há associação entre a seleção de animais com maior perímetro escrotal aos 12 meses de idade e a escolha de animais que apresentassem maiores níveis de hormônios gonadotrópicos, culminando com a puberdade, início de atividade reprodutiva de machos e fêmeas, concepções mais precoces na primeira estação de monta e antecipação das idades de fêmeas ao primeiro parto. Corroborando, Pereira (1999) salienta que, aos 18 meses de idade, a maioria dos tourinhos já estaria em período pós-púbere e a seleção praticada para maiores perímetros escrotais nessa idade estaria associada a maiores pesos corporais e não à maior precocidade reprodutiva em ambientes de clima tropical.

Dias (2004) e Silveira (2004) encontraram correlação elevadas entre motilidade e vigor de 0,81 e 0,68, respectivamente, trabalhando com bovinos. Entretanto, Vasconcelos (2001) registrou valores menores ao estimar valores de correlação em duas populações de touros da raça Nelore.

Em um estudo realizado por Hage (2009) utilizando 1647 touros jovens da raça Nelore em fazenda no estado de São Paulo, foram relatadas correlações de média a alta entre motilidade e vigor (0,76).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE EXPERIMENTAÇÃO

O experimento foi conduzido na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN) da Universidade Federal do Pará localizada no Município de Castanhal (Figura 1A), no Nordeste Paraense ( $1^{\circ} 18' 17,9''$  de latitude (S) e  $47^{\circ} 56' 30,2''$  de longitude (W)) distando cerca de 74 Km da cidade de Belém e, na Unidade de Pesquisa Animal “Dr. Felisberto Camargo” ( $01^{\circ} 26' 42,27''$  S e  $48^{\circ} 25' 12,30''$  W), propriedade Embrapa da Amazônia Oriental (EMBRAPA), localizado em Belém, Pará (Figura 1B).

O clima de Castanhal está enquadrado na categoria megatérmico úmido, tipo Ami, na classificação de Köppen, caracterizado por chuvas abundantes o ano inteiro, com maior índice de precipitação de dezembro a maio e menor de junho a novembro. Durante o período de realização do experimento (abril/2008 a janeiro/2009) a temperatura média mensal foi de  $26,7^{\circ}\text{C}$  (oscilando entre  $23,7^{\circ}\text{C}$  e  $29^{\circ}\text{C}$  com a máxima chegando em  $34,1^{\circ}\text{C}$  e a mínima em  $21,8^{\circ}\text{C}$ ), com uma umidade relativa média mensal de 80,1% (máximo de 91% e mínimo 75%) e, precipitação pluviométrica média mensal de 99,9 mm (INMET, 2009).

Em Belém, o tipo climático também se caracteriza por ser tropical chuvoso, classificado como Afi, com estação chuvosa de dezembro a maio e menos chuvosa de junho a novembro. Durante o período que compreendeu a pesquisa (março/2009 a julho/2009) a temperatura média mensal foi de  $26,8^{\circ}\text{C}$  (oscilando entre  $25,9^{\circ}\text{C}$  e  $28,4^{\circ}\text{C}$  com a máxima de  $32,7^{\circ}\text{C}$  e a mínima em  $23,0^{\circ}\text{C}$ ), com uma umidade relativa média mensal de 88% (máximo de 94% e mínimo 78,9%), precipitação pluviométrica média mensal de 331,4 mm (Laboratório Bioclimatologia - EMBRAPA, 2009).



**Figura 1A:** Foto de satélite da localização da Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN). **Figura 1B:** Foto de satélite da localização da Unidade de Pesquisa Animal “Dr. Felisberto Camargo” (EMBRAPA).

#### 4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E MANEJO

No presente experimento foram utilizados seis búfalos da raça Murrah com idade média de  $50 \pm 2$  meses (Figuras 2A e 2B), os quais foram submetidos a um exame clínico geral com ênfase ao trato genital. Após período de adaptação e de condicionamento a monta controlada com desvio do pênis em búfalas estrogenizadas, os animais foram submetidos a colheita de sêmen por vagina artificial, antes (pré-insulação), durante (insulação) e após a insulação (pós-insulação). As búfalas foram induzidas ao cio utilizando Cipionato de Estradiol (ECP– Pfizer®) na dose de 5ml (2mg/ml), e Prostaglandina ( $PGF_2$ ) (Lutalyse – Pfizer®) na dose de 2ml (5mg/ml), no período de condicionamento dos animais, com intervalos de 10 a 15 dias.

Os animais foram mantidos em piquetes separados, alimentação fornecida foi forragem verde - Capim Elefante (*Pennisetum purpureum Schum*), no caso dos três animais utilizados na CEBRAN, enquanto que os três animais usados na EMBRAPA permaneceram em piquete de Quicuío (*Braquiaria humidicola*) todos com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. Durante a insulação experimental (168 hs) os animais permaneceram em um curral com sombra, onde também havia água, sal mineral e forragem verde.



**Figura 2A:** Foto dos animais submetidos a insulação testicular - CEBRAN.



**Figura 2B:** Foto dos animais submetidos a insulação testicular - Unidade de Pesquisa Animal “Dr. Felisberto Camargo” (EMBRAPA).

#### 4.2.1 Exame clínico geral

Foi realizado através da inspeção, em estação e em movimento, dos tratos: nervoso, respiratório, circulatório, digestivo, e locomotor, com verificação da condição dos aprumos, articulações, e cascos, assim como da condição corporal (VALE, 2005).

#### 4.2.2 Exame do trato genital

Foi realizado através da inspeção e palpação do escroto, testículos (forma, simetria, consistência, mobilidade, sensibilidade, temperatura, posição, tamanho e biometria testicular), epidídimos, cordões espermáticos, prepúcio, pênis e genitália interna (VALE, 2005).

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com um tratamento e seis repetições. Durante o estudo foram utilizados seis animais, sendo o sêmen colhido duas vezes por semana antes e após insulação e, todos os dias durante o período de insulação. Os valores obtidos no período pós-insulação foram comparados à média dos valores pré-insulação. O período experimental foi de 120 dias (17 semanas aproximadamente) em ambos os grupos, sendo dividido em cinco fases:

Pré-insulação (PI): Período compreendido entre o dia 01 e a última coleta realizada antes do processo de insulação;

Insulação (I): Período em que foram insulados os animais com duração de uma semana (7 dias);

Pós-insulação até trinta dias (P30): Período que compreende o dia 0, como o dia da retirada da bolsa até o dia 30;

Pós-insulação até sessenta dias (P60): período compreendido do dia 31 aos 60 dias;

Pós-insulação até noventa dias (P90): período compreendido do dia 61 aos 90 dias;

### 4.4 INSULAÇÃO TESTICULAR

Os animais foram submetidos a um trabalho de condicionamento e programa de colheita de sêmen para avaliação das características físicas e morfológicas dos ejaculados antes, durante e após insulação escrotal.

Em seis animais foram utilizadas bolsas, constituída de saco plástico, goma arábica para fixação do algodão a pele escrotal, fita adesiva (silver tape 3M) e esparadrapo. A bolsa revestida internamente por algodão foi fixada ao redor do funículo e da bolsa escrotal, por um período de sete dias (168hs). Durante este período foi verificada a temperatura retal, temperatura do funículo e a temperatura entre a pele do escroto e o saco plástico, em diferentes horários, sendo as 06:00, 12:00 e 18:00 hs (Figuras 3A e 3B).



**Figura 3A:** Foto da temperatura retal mensurada em animais insulados. **Figura 3B:** Foto referente à temperatura no interior da bolsa testicular em animais insulados.

Três animais denominados (A, B, C) foram submetidos a insulação testicular na CEBRAN (Propriedade-01) e outros três animais (D, E, F) na EMBRAPA (Propriedade-02). Os meses de insulação foram agosto de 2008 e abril de 2009 respectivamente.

No momento da retirada das bolsas foram anotados os dados referentes ao estado da pele do escroto, biometria dos testículos, consistência do parênquima testicular e do epidídimo, assim como avaliação das glândulas anexas dos animais.

#### 4.5 COLHEITA E ANÁLISE DOS EJACULADOS

Durante o período de insulação testicular os animais foram submetidos a colheita de sêmen por meio de vagina artificial diariamente, antes, durante e pós-insulação, duas vezes por semana. Cada ejaculado foi submetido a uma avaliação física e morfológica para determinação de: volume (mL), aspecto (aquoso, turvo, leitoso, leitoso-espesso, cremoso e cremoso-espesso), turbilhonamento, motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), vigor (0-5), concentração espermática ( $\times 10^9$  spz/mL), viabilidade, e pH, segundo metodologia preconizada por Vale (2006).

Foram obtidas uma (01) a duas (02) colheitas do sêmen, em fêmeas usadas como manequim, através de vagina artificial com temperaturas entre 44 a 46°C, sendo realizada uma falsa monta antes de cada colheita (Figuras 4A e 4B).



**Figura 4A: Sêmen coletado usando búfala como manequim - CEBRAN.** **Figura 4B: Sêmen coletado usando búfala como manequim - EMBRAPA.**

O volume em cada amostra foi mensurado imediatamente após a colheita, pela leitura diretamente no copo coletor ou tubo de ensaio graduado, convenientemente aferido em  $\text{cm}^3$ .

O aspecto foi avaliado através de inspeção visual e representa principalmente a cor e a aparência, do ejaculado, que depende fundamentalmente da concentração de espermatozóides.

Para o turbilhonamento, uma alíquota do ejaculado foi retirada, com auxílio de micropipeta, sendo colocada uma gota sobre lâmina previamente aquecida a 37°C e, com auxílio de microscópio óptico, foi observado o movimento em forma de onda dos espermatozóides, utilizando-se uma classificação de 0-5 (onda fraca-forte) no aumento de 20X.

Para motilidade examinou-se uma gota de sêmen puro, entre uma lâmina e uma lamínula em placa previamente aquecida a 37°C. Com auxílio de microscópio óptico em 40X, foi observado o percentual de espermatozóides em movimento progressivo retilíneo. Da mesma forma foi analisado o vigor (força do movimento) e classificado numa escala de 0 a 5.

O espectrofotômetro foi utilizado para determinar a concentração do ejaculado, onde a diluição foi realizada colocando 40 $\mu\text{l}$  de sêmen em 4ml de água destilada, sendo homogenizado antes da leitura.

A coloração eosina-nigrosina permitiu analisar a proporção de espermatozóides vivos e mortos (viabilidade) (Figura 5). Uma gota de sêmen e uma gota de corante foram



homogenizadas, após trinta segundos foi realizado o esfregaço. Depois da secagem a lâmina foi levada ao microscópio, onde se observou em aumento de 100X a presença de espermatozóides vivos e mortos na contagem de 100 espermatozóides (JOSEY, 1974; VALE, 2005).

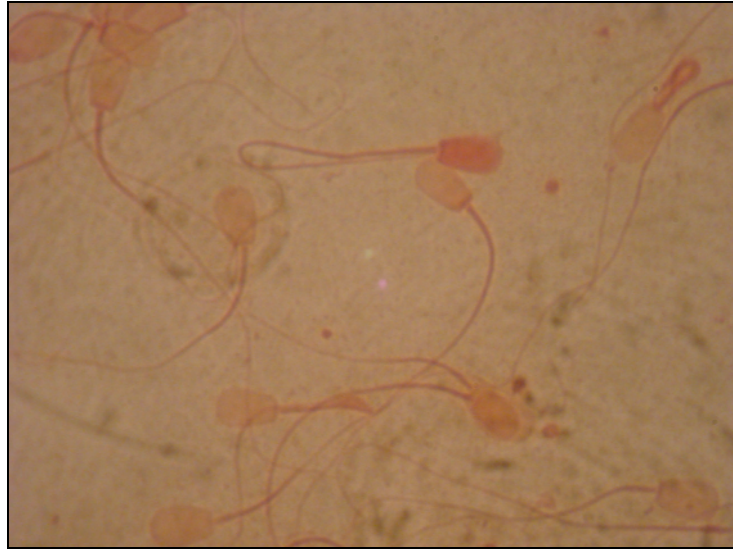
O pH foi determinado através de fitas indicadoras que umedecidas reagiram adquirindo uma mudança de cor, o qual determinou o valor de pH exato da amostra de sêmen.

De cada ejaculado foram preparados quatro esfregaços em lâminas para coloração e preparação de um tubo de eppendorf contendo solução de formol-salino ao 10%, onde foi adicionado duas gotas de sêmen para a análise em preparação úmida (Figura 6). Tanto a preparação úmida como as lâminas coradas foram observadas em microscópio de contraste de fase, através de óleo de imersão com aumento de 100X. Foram contados 200 espermatozóides e as anormalidades espermáticas foram classificadas em defeitos menores e maiores e dadas em porcentagens (VALE, 2005).

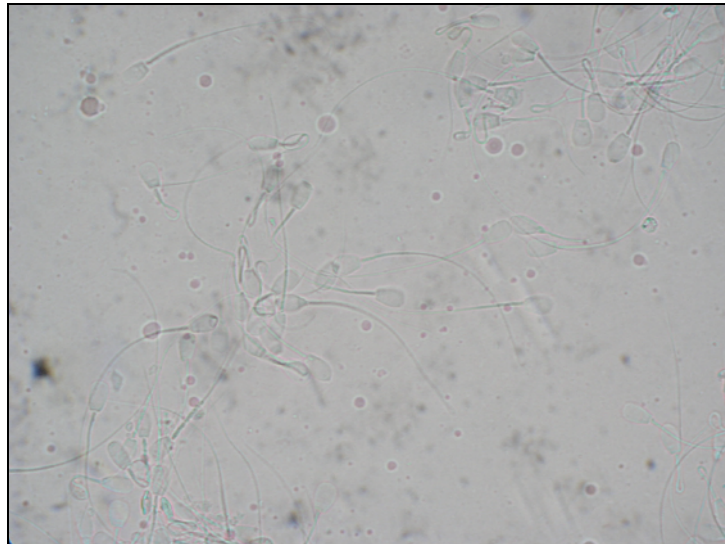
As lâminas foram coradas pelo método de Cerovsky, de acordo com a seguinte descrição:

#### **4.5.1 Método de Cerovsky**

O método consiste na colocação de lâminas submersas dentro de cubetas, na solução de Vermelho do Congo a lâmina permaneceu por um minuto, sendo esta posteriormente lavada com água destilada. Depois de secar submergiu-se por trinta segundos em solução de Violeta Genciana e lavou-se novamente com água destilada. A lâmina corada foi analisada sob imersão, em microscópio de contraste de fase no aumento de 1000X (Figura 7) (CEROVSKY, 1976).



**Figura 5: Coloração Eosina – Nigrosina para contagem de vivos e mortos. Obj. 200X.**



**Figura 6: Preparação úmida - formol salino para análise de anormalidades espermáticas. Obj. 100X.**



**Figura 7: Lâmina corada pelo método de Cerovsky. Obj. 100X.**

#### 4.6 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Para a realização do exame histopatológico foi realizada a orquiectomia unilateral dos testículos nos animais (A, B, C) da propriedade 01 após insulação aos 20, 40 e 60 dias de retirada a bolsa.

Dos testículos foram colhidos fragmentos de 10 mm de espessura por 20 mm de comprimento das partes proximal, medial e distal do testículo e do epidídimo. Os fragmentos foram fixados em solução de ALFAC (85 ml de Álcool Etilico 80%, 10 ml de Formol PA e cinco mililitros de ácido acético glacial, preparado no momento do uso, fixado durante 24 horas, e mantido posteriormente em álcool etílico 70% até o processamento), sendo depois recortado, desidratado, diafanizado em xilol, incluído em parafina, microtomizado com cinco micrômetros de espessura e corado pela hematoxilina-eosina (LUNA, 1968; SARTORI et al., 2002).

Foram avaliados no exame histopatológico: epitélio seminífero, diversos segmentos do epidídimo e o conteúdo celular no lume dos túbulos seminíferos e ductos epididimários, em aumento de 20X e 40X.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com um tratamento (insulação testicular) e cinco fases (pré-insulação, insulação, pós-insulação com trinta dias, pós-insulação sessenta e pós-insulação com noventa dias) e seis repetições (número de animais). Com a primeira colheita no mês de abril/2008 e ultima julho/2009.

Os dados foram analisados no programa SAS – “Statistical Analysis System” (SAS, 1997). Para obtenção de médias e erros padrão para todas as variáveis estudadas (volume, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração, viabilidade, pH, defeitos maiores, menores e totais) foi utilizado o teste SNK ( Student-Newman-Keuls), com probabilidade de 1%.

Da mesma forma, foi aplicada a correlação de Pearson para análise das variáveis estudadas (volume, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração, viabilidade, pH, defeitos maiores, menores e totais).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Os exames clínicos geral dos seis touros utilizados no presente experimento foram avaliados segundo a metodologia preconizada por Vale (2005). Antes da colocação das bolsas nos testículos, evidenciaram um estado normal e sem a presença de qualquer lesão ou malformação nas partes interna e externa do trato genital. Os testículos apresentaram-se com mobilidade normal dentro da bolsa, simétricos, com diâmetro e volume dentro dos padrões normais para a idade, consistência tenso-elástica e corretamente posicionados na região inguinal. Os epidídimos atenderam a todas as exigências mínimas segundo, os padrões para touros normais, bem como o cordão espermático que não apresentou alterações. As glândulas anexas foram consideradas satisfatórias quanto à posição, tamanho, forma e consistência. O escroto não apresentou lesão externa ou qualquer outro sinal clínico.

Entretanto, imediatamente após a remoção das bolsas insuladoras, notou-se irritação dérmica variando de leve a moderada e principalmente na região do funículo, provocada por hiperemia, temperatura local elevada, e sensibilidade aumentada, porém houve uma rápida recuperação aproximadamente em cinco dias. Em todos os animais foi verificada a circunferência escrotal, medida com fita métrica, e a consistência do testículo, a qual foi classificada em flácida, firme elástica diminuída, firme elástica, firme elástica aumentada e endurecida (fibrose) segundo Santos e Simplicio (2000), estes dados são apresentados na tabela 1. Entretanto observou-se uma flacidez muito acentuada no animal “B”, sem recuperação do quadro espermático normal (azoospermia), característico de degeneração testicular severa Vale Filho (2001). Este fato também foi observado por outros autores como Sousa (2006) e Moreira, Moura e Araújo (2001) em carneiros da raça Santa Inês, Ohashi; Nur (1985) em touros suecos vermelho e branco.

**Tabela 1: Medidas de circunferência escrotal e consistência testicular antes e após insulação em touros bubalinos submetidos a insulação testicular.**

Animal	Pré-insulação		Pós-insulação	
	Consistência do Testículo	C.E. (cm)	Consistência do Testículo	C.E. (cm)
A	Normal	30	Firme elástica diminuída	29,5
B	Normal	33,5	Firme elástica diminuída	33,1
C	Normal	35	Flácida	34,4
D	Normal	30	Firme elástica diminuída	29,1
E	Normal	27,5	Firme elástica diminuída	26,4
F	Normal	26	Firme elástica diminuída	26

Durante o período de insulação, os valores médios de temperatura retal, temperatura do funículo e a temperatura entre a bolsa e a pele do escroto foram  $38,4 \pm 0,60^{\circ}\text{C}$ ;  $33,8 \pm 1,28^{\circ}\text{C}$  e  $35,9 \pm 0,91^{\circ}\text{C}$ , respectivamente; valores detalhados são encontrados na tabela 2 nos diferentes horários em que foi realizada a mensuração. Antes da insulação, a temperatura retal média foi de  $39,2 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , confirmando que o estresse térmico imposto às gônadas não teve efeito sobre a temperatura retal. Resultados semelhantes foram encontrados por Moreira, Moura e Araújo (2001) em carneiros da raça Santa Inés e Garcia (2004) em bovinos da raça Simental.

**Tabela 2: Médias e erros padrão das temperaturas retal, do funículo e bolsa de insulação no período de insulação testicular de touros bubalinos.**

Horário	Temp. Retal	Max	Min	Temp. Funíc.	Max	Min	Temp. Bolsa	Max	Min
06:00	$37,7 \pm 0,35$	38,3	36,9	$32,9 \pm 1,22$	35,0	30,0	$35,1 \pm 0,50$	36,2	34,3
12:00	$38,9 \pm 0,45$	39,8	38,0	$34,7 \pm 1,03$	36,0	33,0	$36,6 \pm 0,88$	38,7	34,4
18:00	$38,5 \pm 0,24$	39,1	38,1	$33,9 \pm 0,98$	35,0	31,0	$35,8 \pm 0,61$	37,0	34,5

Não foram detectadas ocorrências de enfermidades após a retirada da bolsa, mas sim alterações no comportamento de alguns animais durante o período de insulação como a diminuição da libido e em alguns casos agressividade no momento da coleta. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Fonseca (1976) e Moreira, Moura e Araújo (2001).

## 6.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN

A insulação testicular alterou as características físicas e morfológicas do sêmen em todos os animais, variando de intensidade entre os indivíduos. Médias e erros padrão de volume, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração, viabilidade e pH são apresentados nas tabelas 3 e 4.

A cor e aspecto do sêmen coletado, nos animais insulados não sofreu modificações pela insulação testicular tendo uma variação de branco-aquoso, branco-leitoso a cremoso, com exceção de um único animal que apresentou azoospermia, cujo aspecto foi translúcido, como consequência da hipertermia testicular a qual causou aspermia, aumento da taxa de mutações e alteração da espermatogênese, levando a infertilidade e esterilidade do touro segundo Blanchard et al. (1992). Estes resultados também foram semelhantes aos encontrados por Fonseca (1976) em animais zebu.

A insulação não afetou ( $P > 0,01$ ) o volume após o período de tratamento, por conseguinte, não representou um parâmetro fidedigno para avaliar os efeitos do desafio

térmico testicular (Tabela 3 e Gráfico 3), corroborando os resultados reportados por Santos e Simplicio (2000) em caprinos. Entretanto, os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados por Moreira, Moura e Araújo (2001) e Sousa (2006), em carneiros Santa Inês criados no Estado do Ceará e Pará, respectivamente, porém diferente aos encontrados por Fonseca (1976) em animais zebu, o autor encontrou diferenças entre as fases pré e pós-insulação. Já Coelho et al. (2006) encontraram em caprinos da raça Saanen e Pardo–Alpina diminuição do volume, no período pós-insulação, assim como, Chacur, Oba e Ramos (2001) em bubalinos, mantidos em câmara climática com temperatura do ar a 39° C por 9 horas diárias, durante 54 dias.

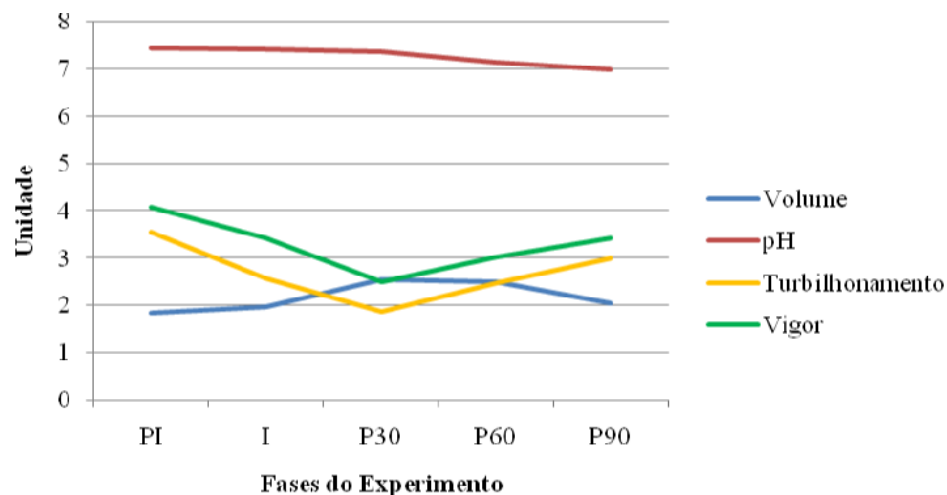
**Tabela 3 – Médias e erros padrão de volume (ml), turbilhonamento, motilidade individual progressiva e vigor seminal de bubalinos com insulação testicular.**

Fases	Volume (ml)	Turbilhonamento (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
PI	1,84±1,50 <sup>a*</sup>	3,55±0,88 <sup>a</sup>	78,98±7,52 <sup>a</sup>	4,07±0,74 <sup>a</sup>
I	1,97±0,92 <sup>a</sup>	2,58±1,22 <sup>bc</sup>	67,56±16,52 <sup>ba</sup>	3,43±0,83 <sup>ba</sup>
P30	2,59 ± 1,51 <sup>a</sup>	1,87±1,37 <sup>c</sup>	36,53±20,87 <sup>d</sup>	2,51±1,12 <sup>c</sup>
P60	2,52±0,87 <sup>a</sup>	2,48±1,50 <sup>bc</sup>	53,33±30,49 <sup>c</sup>	3,02±1,55 <sup>bc</sup>
P90	2,04±0,82 <sup>a</sup>	3,00±1,82 <sup>ab</sup>	59,82±33,81 <sup>bc</sup>	3,42±1,81 <sup>ba</sup>

PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90).

\*Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls) (P>0,01).

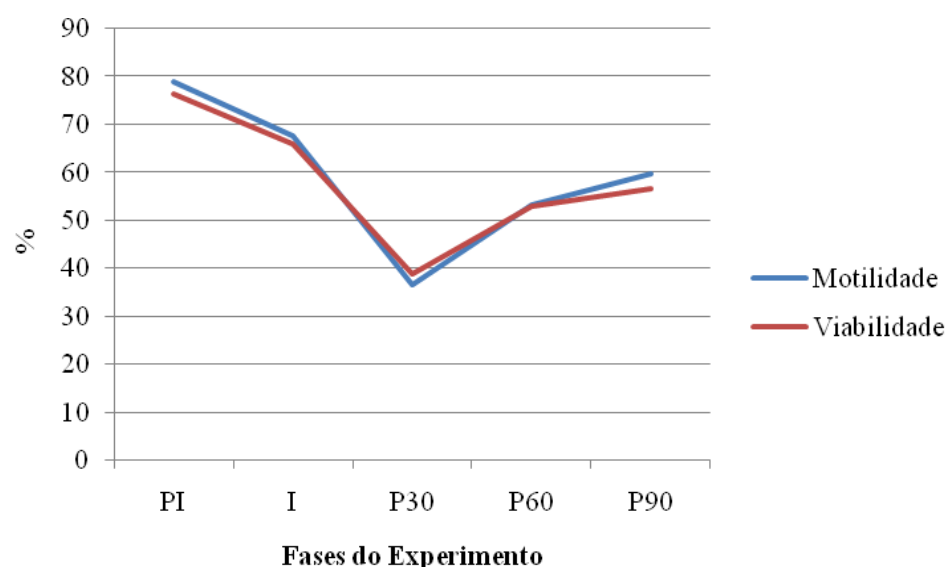
O turbilhonamento foi reduzido significativamente (P<0,01) no período de insulação, no P30 e P60, não apresentando contudo, diferença significativa no período pós-insulação aos 90 dias quando comparada com a pré-insulação (PI) (Tabela 3 e Gráfico 1). A redução do turbilhonamento é resultado da depressão da espermatogênese como consequência da elevação da temperatura testicular a que foram submetidos os animais no período da experimentação. Resultados semelhantes foram encontrados por Fonseca (1976), Garcia (2004) em bovinos da raça Gir e Simental e Chacur, Oba e Ramos (2001) em bubalinos, respectivamente.



**Gráfico 1:** Valores médios de volume, pH, turbilhonamento e vigor durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).

O vigor espermático (Tabela 3 e Gráfico 1) apresentou uma diminuição ( $p < 0,01$ ) no P30 quando comparado ao período de pré-insulação, insulação, P60 e P90 sendo o P30 o período mais crítico, em consequência do elevado percentual de patologias e morte das células espermáticas, decorrentes do processo de insulação, evidenciando assim o pico de degeneração do epitélio seminífero.

Achados semelhantes foram encontrados por Sousa (2006). Também Santos e Simplicio (2000) em caprinos e Pezzini et al. (2006) em touros curraleiros e holandeses, apresentaram diferenças significativas em relação a esta variável.



**Gráfico 2:** Valores médios de motilidade e viabilidade espermática durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).



A motilidade progressiva (Tabela 3 e Gráfico 2) diminuiu significativamente ( $P < 0,01$ ) no P30, P60 e P90 quando comparado com período pré-insulação e insulação, indicando que os espermatozoides alojados no epidídimo foram afetados pelo aumento da temperatura imposto pela insulação, levando a um aumento das patologias espermáticas, fato este também observado por Ohashi; Nur (1985) em touros da raça sueco vermelho e branco. Estes resultados também são semelhantes aos descritos por Brito et al. (2003), Coelho et al. (2006), Fonseca (1976) e Januskauskas et al. (1995) em touros da raça sueco vermelho e branco insulados por oito horas.

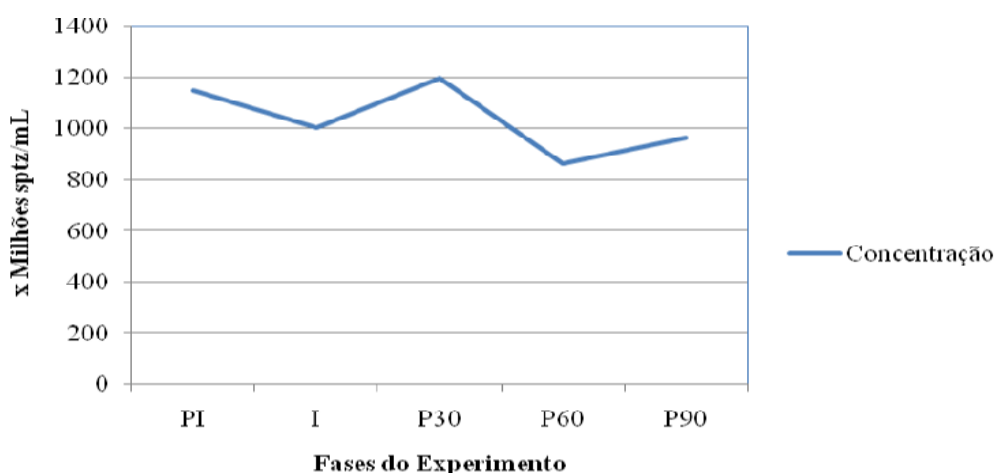
A concentração não apresentou diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre o período pré-insulação e pós-insulação aos 30, 60 e 90 dias (Tabela 4 e Gráfico 3), embora tenha apresentado uma diminuição em relação ao período pré-insulação como consequência da retirada de um dos testículos para exame histopatológico. Em três animais experimentais evidenciou-se, também, uma diminuição no período da insulação que provavelmente pode estar atribuído às sucessivas colheitas realizadas neste período. Estes resultados diferem dos encontrados por Brito et al. (2003) em bovinos, Sousa (2006) em ovinos, Santos e Simplicio (2000) e Coelho et al. (2006) em caprinos.

**Tabela 4 - Médias e erros padrão de concentração ( $\times 10^6/\text{ml}$ ), viabilidade (%) e pH seminal de bubalinos com insulação testicular.**

Fases	Concentração ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Viabilidade (%)	PH
PI	1140 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	74,92 $\pm$ 12,87 <sup>a</sup>	7,45 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>
I	1000 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	66,16 $\pm$ 17,79 <sup>ba</sup>	7,43 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
P30	1190 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	39,00 $\pm$ 22,78 <sup>c</sup>	7,37 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
P60	880 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	53,02 $\pm$ 30,64 <sup>b</sup>	7,15 $\pm$ 0,49 <sup>ba</sup>
P90	960 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	56,67 $\pm$ 32,69 <sup>b</sup>	6,98 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>

PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90).

\*Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls) ( $P > 0,01$ ).



**Gráfico 3: Valores médios de concentração espermática durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).**

Os resultados de viabilidade (Tabela 4 e Gráfico 2) obtidos ao longo do experimento mostram uma queda no P30 ( $P < 0,01$ ) quando comparado ao PI, I, P60 e P90. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Santos e Simplício (2000) e Sousa (2006).

O quadro seminal dos animais insulados evidenciou uma diferença significativa ( $P < 0,01$ ) no pH nos períodos P60 e P90 em relação a PI, I, P30 (Tabela 4 e Gráfico 1). Embora esta diferença seja significativa, observa-se que o pH permanece dentro dos valores normais definido para a espécie bubalina segundo Vale (2002) e Aguiar et al. (1996), porém não parecendo ser influenciada pela insulação testicular.

As Tabelas 5 e 6 descrevem as médias e erros padrão dos parâmetros seminais em cada fase do experimento, sendo o P30, o período crítico em ambas as propriedades.

**Tabela 5 - Médias e erros padrão dos parâmetros seminais de três touros bubalinos na propriedade 1.**

PARÂMETROS SEMINAIS	FASES – PROPRIEDADE 1				
	PI	I	P30	P60	P90
Vol. (ml)	2,33±1,85	1,74±0,81	3,00±1,74	2,65±1,05	2,29±0,98
Conc. ( $\times 10^6$ spztz/ml)	1355,92±687,79	1246,38±680,92	1291,90±948,01	713,27±745,81	549,69±654,93
Turb. (0-5)	3,87±0,70	1,69±0,95	1,67±1,68	1,13±1,25	1,54±1,66
Mot. (%)	78,72±6,86	57,81±19,66	26,43±20,07	24,00±23,24	34,23±34,87
Vigor (1-5)	4,10±0,60	3,31±0,87	2,38±1,36	1,80±1,74	2,23±2,05
Viab. (%)	75,46±8,20	57,69±22,25	26,71±20,04	22,80±22,56	31,62±33,18
pH	7,38±0,63	7,38±0,50	7,33±0,48	7,20±0,41	7,08±0,28

PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 – Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 – Pós-insulação (dia 61- 90).

**Tabela 6 - Médias e erros padrão dos parâmetros seminais de três touros bubalinos na propriedade 2.**

PARÂMETROS SEMINAIS	FASES – PROPRIEDADE 2				
	PI	I	P30	P60	P90
Vol. (ml)	1,31±0,76	2,16±0,92	2,13±0,96	2,43±0,96	1,83±0,92
Conc. ( $\times 10^6$ spztz/ml)	920,28±487,89	820,71±479,20	1083,72±458,67	969,67±437,13	1321,13±450,66
Turb. (0-5)	3,23±1,0	3,26±0,98	2,11±1,07	3,45±1,04	4,27±1,08
Mot. (%)	78,97±8,1	75,00±12,03	48,33±18,29	74,29±17,95	82,00±17,88
Vigor (1-5)	4,03±0,9	3,52±0,94	2,67±1,05	3,90±0,99	4,47±1,01
Viab. (%)	77,28±7,3	72,62±12,05	53,33±16,96	74,62±16,73	78,40±16,63
pH	7,54±0,7	7,48±1,09	7,42±1,20	7,12±1,24	6,90±1,29

PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 – Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 – Pós-insulação (dia 61- 90).

**Tabela 7- Médias e erros padrão nas fases de PI, I, P30, P60, P90 de defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e defeitos totais dos ejaculados dos animais insulados.**

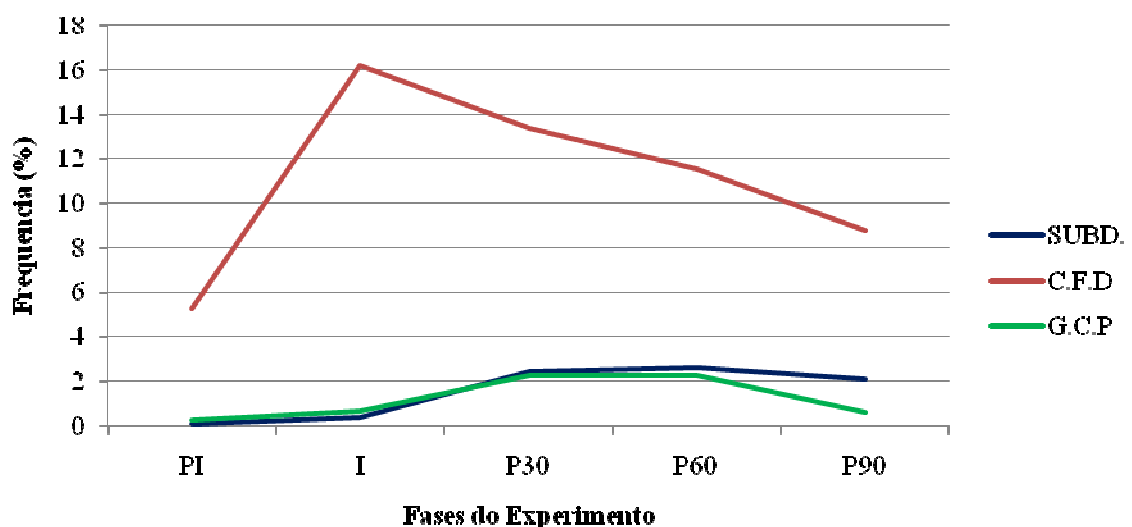
FASES	DEF. MAIOR	DEF. MENOR	D. TOTAIS
PI	5,79±3,17 <sup>c</sup>	4,65±3,09 <sup>c</sup>	10,43±4,42 <sup>c</sup>
I	17,27±13,98 <sup>ba</sup>	16,39±15,86 <sup>b</sup>	33,66±19,71 <sup>b</sup>
P30	23,42±14,73 <sup>a</sup>	32,74±20,42 <sup>a</sup>	56,19±19,55 <sup>a</sup>
P60	14,77±13,99 <sup>b</sup>	16,19±13,37 <sup>b</sup>	30,97±22,19 <sup>b</sup>
P90	10,87±15,46 <sup>bc</sup>	8,00±8,74 <sup>cb</sup>	18,87±20,64 <sup>c</sup>

PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 – Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 – Pós-insulação (dia 61- 90).

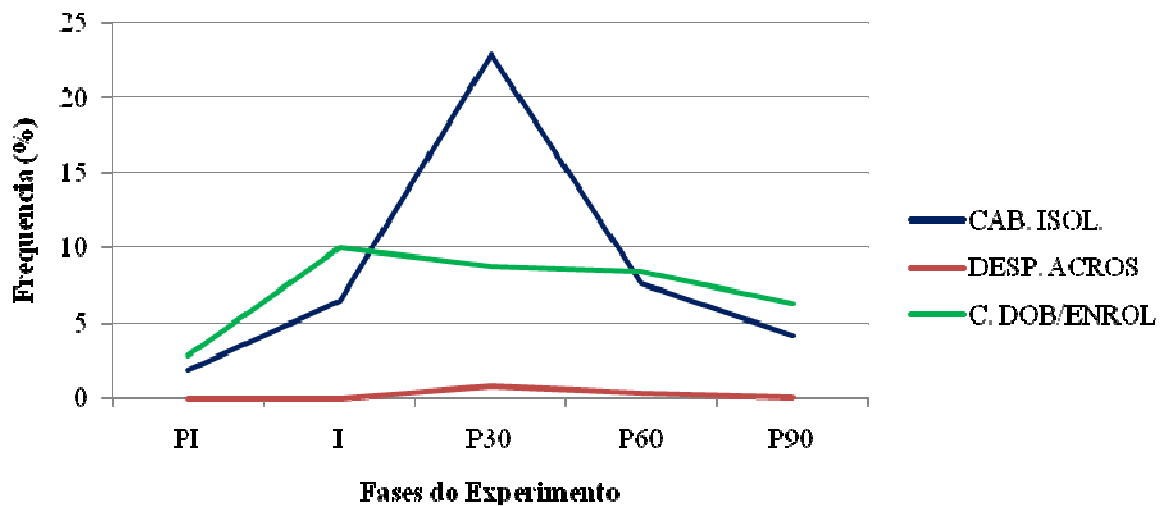
\*Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls) ( $P > 0,01$ ).

Variações significativas também foram observadas nas respectivas fases estudadas da morfologia espermática. Houve diferença na porcentagem de espermatozóides anormais, quando comparadas às patologias classificadas como defeitos maiores (Tabela 7), antes e depois da insulação, sendo que os percentuais foram maiores no período de insulação (I) e P30 ( $P < 0,01$ ) quando comparado com os períodos de 60 e 90 dias pós-insulação. Os defeitos de maior ocorrência na fase P30 foram: espermatozóides subdesenvolvidos (2,60%), cauda fortemente dobrada (16,2%) e gota citoplasmática proximal (2,24%) (Gráfico 4). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Pezzini et al. (2006) em touros da raça holandesa. De acordo com Fonseca e Chow (1995) e Gabaldi (2000) em animais zebuínos, a insulação escrotal, por períodos de 96 e 168 horas respectivamente, resultaram em aumento da morfologia espermática, segundo os autores foi necessário de 105 e 148 dias, para retornarem aos valores normais. Também Garcia (2004) em bovinos da raça Simental encontrou resultados semelhantes aos do presente trabalho aos 23 dias após o término da insulação.

Com relação aos defeitos menores (Tabela 7), os resultados aqui obtidos mostram uma diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre a fase P30 e PI, P60 e P90 com destaque para as anormalidades de cabeça isolada normal (22,83%), desprendimento de acrossoma (0,74%) e cauda dobrada e enrolada (10%) (Gráfico 5). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Pezzini et al. (2006) na raça Curraleira e Holandesa, que também encontraram alta percentagem destas patologias aos 30 dias pós-insulação. Outro trabalho com resultados similares, ao presente estudo, foi de Garcia (2004), que encontrou um pico de defeitos menores nove dias após a insulação.



**Gráfico 4:** Valores médios de patologias com defeitos maiores (Subdesenvolvido-SUBD., Cauda fortemente dobrada-C.F.D, Gota citoplasmática proximal-G.C.P) durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).



**Gráfico 5:** Valores médios de defeitos menores (Cabeça isolada-CAB. ISOL., Desprendimento de acrossoma-DESP ACROSS., Cauda dobrada enrolada-C. DOB / ENROL) durante o período de experimentação em bubalinos insulados no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).

O mecanismo pelo qual a insulação escrotal leva à formação de espermatozóides anormais é discutido por diversos autores. Setchell (1998) sugere que o aumento de temperatura testicular resulta em incremento do metabolismo e demanda de oxigênio, de tal forma que a vascularização sanguínea testicular não consegue neutralizá-la, levando à hipóxia e formação de oxigênio reativo e, conseqüentemente, à formação de anormalidades espermáticas.

Os resultados referentes à presença dos defeitos totais mostrados na Tabela 7 evidenciam um pico de anormalidades espermáticas no P30 ( $P < 0,01$ ), sendo este o período mais crítico em relação ao PI, I, P60 e P90. Resultados semelhantes foram encontrados por Garcia (2004) em bovinos, Moreira, Moura e Araújo (2001) em ovinos, Santos e Simplicio (2000), Sousa (2006) em caprinos, porém diferente aos encontrados por Coelho et al. (2006) em caprinos submetidos à câmara bioclimática.

### 6.3 CORRELAÇÕES

No presente trabalho foram verificadas altas correlações entre as características físicas ( $P < 0,0001$ ) como motilidade e turbilhonamento (0,81), vigor e turbilhonamento (0,83), vigor e motilidade (0,85), viabilidade e turbilhonamento (0,76), viabilidade e motilidade (0,95) e viabilidade e vigor (0,81), bem como, as características morfológicas como os defeitos totais que apresentaram altas correlações ( $P < 0,01$ ) com os defeitos maiores (0,74) e menores (0,83), como mostra a Tabela 08.

**Tabela 8. Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos e morfológicos dos ejaculados de touros bubalinos submetidos ao processo de insulação testicular no estado do Pará.**

Características <sup>1</sup>										
	VOL	CONC	TURBI	MOT	VIGOR	VIABI	PH	DMAIOR	DMENOR	DTOTAIS
<b>VOL</b>	1									
<b>CONC</b>	0,246	1								
<b>TURBI</b>	0,040	0,479	1							
<b>MOT</b>	-0,139	0,308	0,818*	1						
<b>VIGOR</b>	-0,037	0,519	0,839*	0,855*	1					
<b>VIABI</b>	-0,161	0,328	0,768*	0,956*	0,816*	1				
<b>PH</b>	-0,312	-0,320	-0,225	-0,068	-0,173	-0,020	1			
<b>DMAIOR</b>	0,049	0,173	-0,198	-0,227	-0,037	-0,211	0,039	1		
<b>DMENOR</b>	0,028	-0,065	-0,369	-0,382	-0,329	-0,362	0,120	0,248	1	
<b>DTOTAIS</b>	0,048	0,054	-0,368	-0,394	-0,248	-0,371	0,105	0,744*	0,832*	1

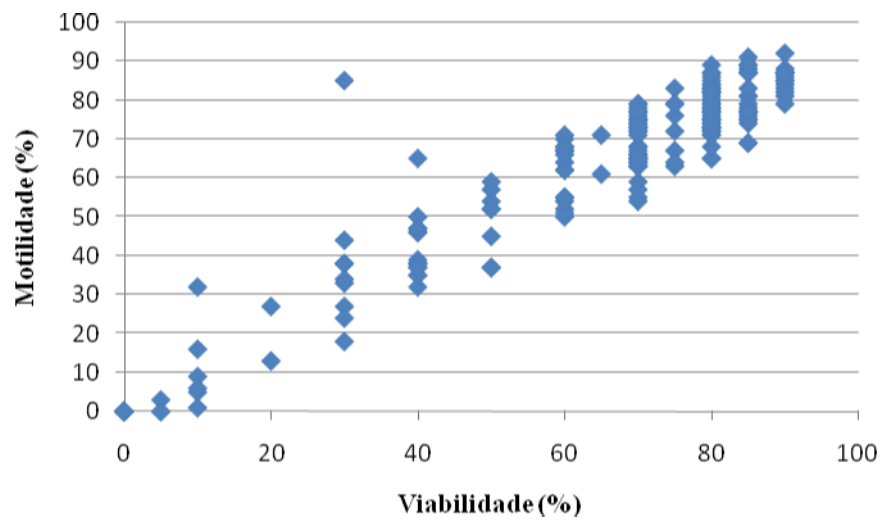
\*(P < 0,0001)

<sup>1</sup>VOL= volume; CONC= concentração; TURBI= turbilhonamento; MOT= motilidade; VIABI= viabilidade; DMAIOR= defeitos maiores; DMENOR= defeitos menores; DTOTAIS= defeitos totais.

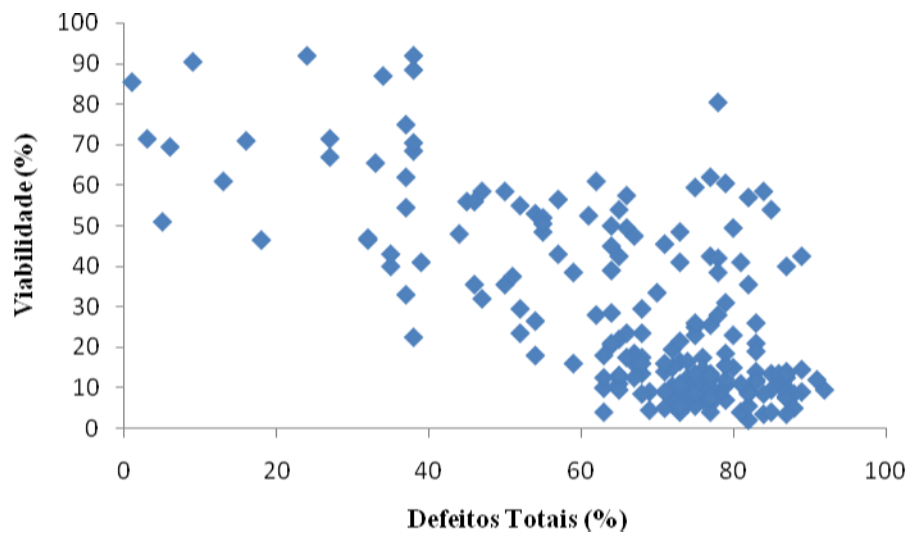
Alta correlação entre motilidade e vigor encontradas neste estudo corrobora com os dados relatados por Dias (2004) e Silveira (2004) que encontraram altas correlações entre esses parâmetros de 0,81 e 0,68, respectivamente, trabalhando com bovinos. Entretanto, Vasconcelos (2001) registrou valores mais baixos ao estimar esses parâmetros em duas populações de touros da raça Nelore. Em um estudo realizado por Hage (2009) utilizados 1647 touros jovens da raça Nelore em fazenda no estado de São Paulo, foram relatadas correlações de média a alta entre motilidade e o vigor (0,76) semelhantes aos dados do presente estudo.

Em trabalhos realizados com bubalinos, Ohashi et al (2007) observaram que os dados biométricos relacionados ao peso corporal e circunferência escrotal apresentaram alta correlação, quando comparados aos dados citados na literatura para bovinos taurinos. O mesmo foi observado em relação ao processo espermatogênico, sendo que, aos 24 meses, os animais já se encontravam aptos à reprodução, mesmo sem terem atingido a capacidade máxima de produção seminal.

Os defeitos maiores apresentaram-se altamente relacionados aos defeitos totais não diferindo dos valores encontrados por Dias (2004) e Silveira (2004) em animais da raça Nelore. Entretanto, defeitos maiores e menores apresentaram baixa correlação, de forma favorável com as demais características avaliadas, o que está de acordo com Hage (2009). O gráfico 6 apresenta as correlações encontradas entre motilidade e viabilidade (0,95), bem como o gráfico 7, que demonstra a presença da correlação negativa existente entre viabilidade e defeitos totais (0,37) encontradas no presente estudo.



**Gráfico 06.** Representação das correlações entre motilidade (%) e viabilidade (%) do sêmen de touros bubalinos submetidos ao processo de insulação testicular no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).

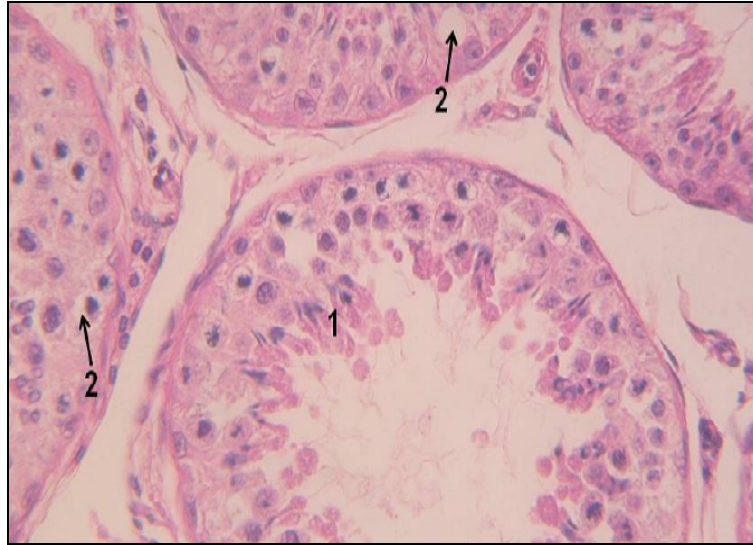


**Gráfico 07.** Representação das correlações entre viabilidade (%) e defeitos totais (%) do sêmen de touros bubalinos submetidos ao processo de insulação testicular no Estado do Pará (PI – Pré-Insulação; I – Insulação; P30 – Pós-insulação (dia 1 a 30); P60 - Pós-insulação (dia 31 a 60); P90 - Pós-insulação (dia 61- 90)).

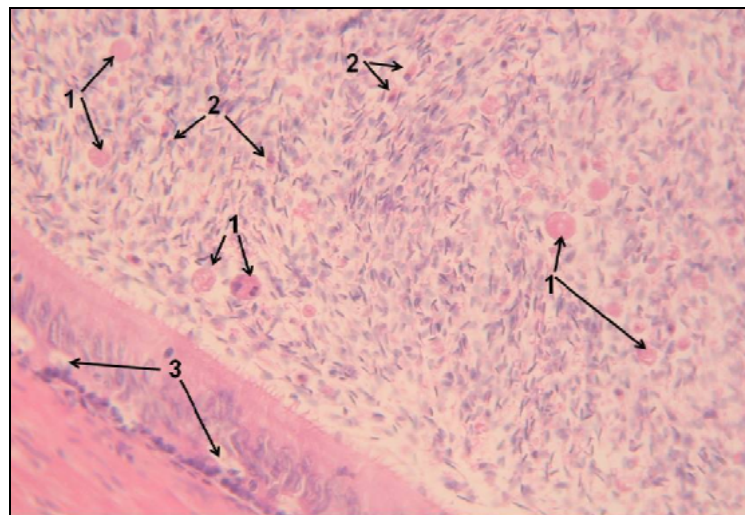
#### 6.4 RESULTADOS DO EXAME HISTOPATOLÓGICO

Durante o decorrer do experimento os animais insulados na Central de Biotecnologia Animal - CEBRAN (Propriedade 1) foram submetidos a orquiectomia unilateral nos dias 20, 40 e 60 após insulação, com a finalidade de confrontar os achados microscópicos do testículo com os observados durante o exame físico e morfológico do sêmen, além de acompanhar o processo de recuperação dos animais, de acordo com o período de espermatogênese que caracteriza a espécie.

O exame observou espermiogênese e testículos exibindo ciclos distintos no caso do touro “A”, vinte dias após a insulação (Figura 8). Presença de alguns túbulos seminíferos com normalidade e vários outros com descamação de células de configuração esferóides (espermatogônias) e de maneira mais abundante células alongadas (espermátides), o que corrobora a presença de células espermáticas no ejaculado na fase mais crítica do experimento (P30). A membrana basal dos túbulos não apresentou alterações; o mesmo foi observado para as células intersticiais. O epidídimo apresentou estruturalmente epitélio com degeneração celular apresentando vacuolização. No lume dos túbulos, abundante colisão de espermatozóides e muitas células germinativas descamadas e morfológicamente nucleadas com eosinofilia (necrose) (Figura 9). Resultados semelhantes foram encontrados por Fonseca (1976) em touros zebu abatidos 16 dias após insulação testicular e por Vale Filho (1979) em touros *Bos Indicus* e *Bos Tauros*.



**Figura 8:** Túbulos apresentando descamação de células germinativas, com um quadro típico de cariólise e picnose nuclear, além de acidofilia citoplasmática (necrose) (1). Além de presença de células germinativas vacuolizadas (2) H.E, 40X.



**Figura 9:** Túbulo epididimário apresentando preenchimento habitual por espermatozoide. Observa-se numerosas células espermatogênicas em necrose espermatócitos (1) e espermatídes (2). Vacuolização de células epididimárias (3) H.E, 40X.

Já no caso do animal “B”, com 40 dias pós insulação foram observados túbulos seminíferos em geral, com vacuolizações de células germinativas. Essas células reduzidas consideravelmente em número eram do tipo espermatogônia e espermatócitos, com raras espermatídes arredondadas (Figura 10). Da mesma forma, foram observadas células de descamação, na sua maioria vivas no lume tubular. Adicionalmente, presenciou-se túbulos contendo quase que exclusivamente células Sertoli, muitos com vacuolização citoplasmática. Não foi observada vacuolização de células do epitélio epididimário e houve ausência de espermatozoides no lume, quando alguns túbulos epididimários apresentaram células descamadas e substância eosinofílica com gotículas esferóides (Figura 11) com o diagnóstico



evidenciando uma degeneração testicular grave. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Fonseca (1976), quando comparados com animais que apresentaram um grau mais avançado de degeneração, caracterizada por severa destruição do epitélio seminífero. Também foram semelhantes aos encontrados por Ahmad et al. (1988) em búfalos criados no pakistan e Blanchard et al. (1992) em garanhões com degeneração testicular.



**Figura 10:** Túbulos seminíferos em geral com vacuolizações de células predominando nas células de Sertoli (1). Células germinativas consideravelmente reduzidas em número, e as presentes são do tipo espermatogônia (2) e espermatócitos (3). H.E., 40X.



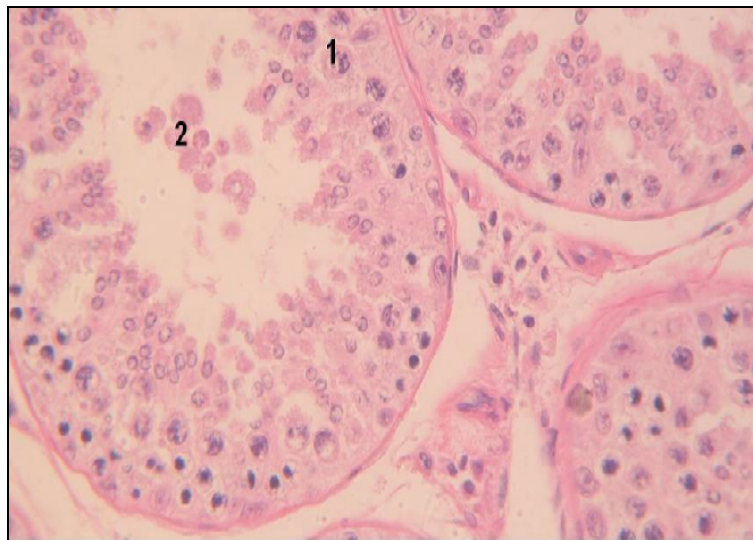
**Figura 11:** Ausência de espermatozoides no lume (1). Vacuolizações de células do epitélio epididimário (2) presença de corpos apoptóticos (3). H.E., 40X.

Aos sessenta dias pós insulação no animal “C”, os túbulos seminíferos apresentaram espermatogênese com ausência de células vacuolizadas e, no lume tubular numerosas células

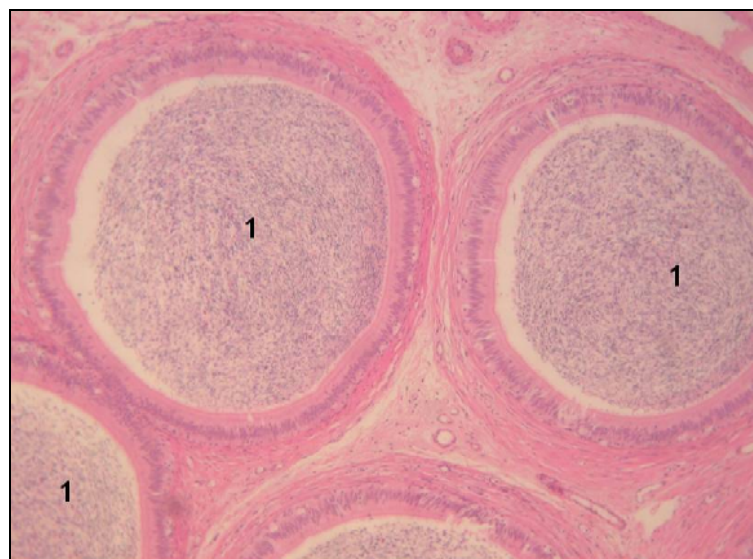
necróticas descamadas, bem como ausência de alterações de células intersticiais e membrana basal de túbulos seminíferos (Figura 12).

No epidídimo houve vacuolização e poucas células epiteliais descamadas e necróticas com picnose e hipereosinofilia citoplasmática, além de presença de espermatozóides nos túbulos epididimários (Figura 13).

Este diagnóstico evidencia uma recuperação embora lenta, corroborando os achados nos exames de morfologia espermática, sendo estes resultados semelhantes aos encontrados por FONSECA (1976) quando aos 71 dias após insulação animais mostraram certo grau de regeneração, caracterizados pela recuperação do epitélio seminífero e início da atividade proliferativa. Também são semelhantes aos resultados encontrados por Rao e Bane (1985) em touros zebu.



**Figura 12:** Túbulos seminíferos com atividade espermatogênica (1). Observa-se descamação de células no lume tubular (2). H.E, 40X.



**Figura 13:** Túbulos epididimário apresentando preenchimento habitual por espermatozóides (1). H.E, 20X.

## 7 CONCLUSÕES

Do presente experimento pode-se concluir que:

- O aumento da temperatura provocado pela insulação artificial no escroto e nos testículos foi responsável por alterações na estrutura das gônadas e conseqüentemente sobre a espermatogênese.
- As características físicas e morfológicas do ejaculado, tais como volume e pH não foram influenciados pela ação do estresse térmico imposto as gônadas.
- A motilidade espermática, o turbilhonamento, vigor e a vitalidade foram influenciados negativamente pela ação do estresse térmico imposto as gônadas.
- O aumento da temperatura local foi responsável por efeitos deletérios na espermatogênese (parênquima testicular) e no processo de maturação dos espermatozóides (epidídimo), conseqüentemente ocasionando um aumento de defeitos maiores, menores no quadro espermático.
- O período crítico aconteceu nos primeiros trinta dias após a insulação testicular, com aumento na freqüência de patologias espermáticas como: espermatozóides subdesenvolvidos, cauda fortemente dobrada, gota citoplasmática proximal (defeitos maiores) e cabeça isolada normal, desprendimento de acrossoma e cauda dobrada e enrolada (defeitos menores).
- Os animais apresentaram período de recuperação entorno de noventa dias após insulação testicular.
- No presente estudo a insulação artificial no escroto, testículos e epidídimos, embora tenham ocasionado um quadro degenerativo acentuado, foi possível haver uma regeneração do processo espermático na maioria dos animais estudados.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. H. P. et al. Aspectos físicos e morfológicos e pH do sêmen de reprodutores bubalinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n.3, p.325-31, jun. 1996.
- AHMAD, N. et al. Post mortem studies on infertile buffalo bulls: Testicular histology. **Veterinary Records**, v.122, p.229-231, 1988.
- ANDERSON, G. B. Fertilization, early development, and embryo transfer. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, Inc., 1991. Cap.8, p.280-315.
- AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHEE, R. L. Effect of the scrotal insulation on semen of Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, n.20, p.307-310, 1961.
- BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexametasone treatment in bulls. **Canadian Journal of Veterinary**, v.35, p.93-102, 1994.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1st ed. Ames: Iowa State University Press, p.285, 1989.
- BARNABE, V. H. Colheita e avaliação o sêmen de búfalos. In: **ANAIS DO 1º SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA**, 1. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 1999, p.122-125.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.
- BLANCHARD, T. L. et al. The causes and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. **Veterinary Medicine**, v.86, p.531-536, 1992.
- BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. F.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of the bull. **Journal Reproduction Fertility**, v.83, p.673-677, 1988.
- BONGSO, T. A.; HASSAN, M.D.; NORDIN, W. Relationship of scrotal circumference and testicular volume to age and bodyweight in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.22, p.127-134, 1984.

BOURDON, R. M.; BRINKS, J. S. Scrotal circumference in yearling Hereford bulls: adjustment factors, heritabilities and genetic, environmental and phenotypic relationships with growth traits. **Journal of Animal Science**. v.62, p.958-967, 1986.

BRITO, L. F. C. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production semen quality, and testicular exhotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.1-15, 2003.

BURFENING, P. J.; ULBERG, L. C. Embryonic survival subsequent to culture of rabbit spermatozoa at 38° and 40° C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.15, p.87-92, 1968.

BYERS, S. W.; GLOVER, T. D. Effect of scrotal insulation on the pituitary-testicular axis of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, n.1, v.71, p.23-31, 1984.

CASADY, R. B.; MYERS, R. M.; LEGATES, J. E. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal Dairy Science**. n.36, p.14 - 23, 1954.

CASSIANO, L. A. P. et al. Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.5, v.39, p.451-457, 2004.

CEROVSKY, J. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**. n.21, p.361-362, 1976.

CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Effect of heat-stress on spermatogenesis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6. **Proceedings...** Maracaibo, Venezuela. Maracaibo: [s.n.]. p.289-294, 2001.

CHEMINEAU, P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.26, n.2A, p.453-460, 1986.

COELHO, L. A. et al. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.544-549, 2006.

COE, P. H.; GIBSON, C. D. Adjust 200-day scrotal size as a predictor of 365-day scrotal circumference. **Theriogenology**, v.40, p.1065-1072, 1993.

COIMBRA, A. S. **Características seminais de touros bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*), taurinos (*Bos taurus taurus*) e bubalinos (*Bubalus bubalis*), doadores de sêmen em condições de trópico úmido amazônico.** 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte, p.49, 1998.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beefbulls. **Theriogenology**, v.4, p.1653-671. 1994.

COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.30, p.47-60, Supplement, 1981.

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: **Reproduction in mammals and man.** Paris: Ellipses, Cap. 13, p.227- 255, 1993.

DIAS, J. C. **Aspectos andrológicos, biometria testicular e parâmetros genéticos de características reprodutivos de touro Nelore, de dois e três anos de idade, criados extensivamente no Mato Grosso do Sul.** 2004, 54p. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

EL-SHARABASSY, A. A. M. et al. Sexual behavior and semen quality in Egyptian Baladi bucks. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v.60, n.12, p.1458-1460, 1990.

ENTWISTLE, K. Effects of heat stress on reproductive function in bulls. **Bull Fertility, Proceedings...**, p.57-63, 1992.

EVERLING, D. M. et al. Estimativas de herdabilidade e correlação genética para características de crescimento na fase de pré-desmama e medidas de perímetro escrotal ao sobreano em bovinos angus-nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, 2001.

**FAOSTAT:** Agriculture data. 2007. Disponível em: <<http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture/>>. Acesso em: 23 de junho de 2009.

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

FONSECA, V. O. **Efeito da elevação térmica experimental sobre a espermatogênese no zebu: aspectos físicos e morfológicos do sêmen, anátomo - patológicos do testículo e epidídimo e alguns processos endócrinos relacionados à afecção**. 1976. 148p. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1976.

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

FONSECA, V. O. CHOW, L. A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.5, v.47, p.707-16, 1995.

GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal**. 2000, 85p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

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

GANGWAR, P. C. Climate and reproduction in buffaloes – a review. **The Indian Journal of Dairy Science**, v.33, p.419-426, 1980.

GARCIA, A. R. **Efeito do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membrana, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 258p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GARCIA, A. R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). **Revista de Ciências Agrárias**. n.45, jan./jun.2006. **Suplemento**.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: editora Manole, 1982. Cap. 9, p.187- 211.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. (Eds.). **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, 2004. p.97-110.

GERONA, G. R.; SIKES, J. D. Effect of elevated scrotum temperature on spermatogenesis and semen characteristics. **Journal Dairy Science**, n. 53, p.659, 1970.

GRESSLER, S. L. **Estudo de fatores de ambiente e parâmetros genéticos de algumas características reprodutivas em animais da raça Nelore**. 1998. 149p. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 1998.

GUNN, S. A.; GOULD, T. C. Vasculature of the testes na adnexa. In: GREEP, R. O., ASTWOOD, E. B. (Eds.) **Handbook of Physiology, Section 7 Endocrinology**. Washington D.C. 1975.

HAGE, W. T. **Estudo da Puberdade e Maturidade Sexual de Touros Nelore no Estado de São Paulo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, 2009.

HARVEY, D. Some aspects of the importance of buffaloes as farmstock. **Nutrition Abstract and Reviews**, Farnham Royal, v.33, p.931-936, 1963.

HULEIHEL, M; LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v.6, n.3, p.259-268, 2004.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: **Reproduction in Domestic Animals**. Academic Press. 1991.

JOHNSON, L. et al. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, n. 48, p.1119-1216, 1997.

JANAKIRAMAN, K. **Some Aspects of reproductive problems in buffaloes**. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2. **Proceedings...** New Deli, India. 1988.

JOSEY, M. J. Semen collection for processing for I.A. In: BULLS. **Course heid at the University of Queensland Veterinary**, Veterinary School, 18-22 February, 1974. 10p.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e Bubalinos. In: Hafez, E. S. E, Hafez, B. **Reprodução Animal**. Barueri, Brasil: Manole. p.159-171, 2004.



JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of brief elevation of scrotal temperature on the post-thaw viability of bull semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v.30, p.271-277, 1995.

KASTELIC, J. P., COOK, R. B., COULTER, G. H. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/ testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-941. 1995.

KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H. Scrotal and testicular thermoregulation in the bull and ram. **Society for Theriogenology – Proc. Annual Meeting, Florida**, p.67-72, 1993.

KRETZER, D. M. et al. Spermatogenesis. **Human Reproduction**, v.13, Suppl 1, p.1-8, 1998.

LAGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **XIII<sup>th</sup> International Veterinary Congress**, Zurich, p.24-25, 1938.

LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968. p.258.

LUNSTRA, D. D.; FORD, J. J.; ECHTERKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: Hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal. Animal. Science**, v.46, p.1054-1062, 1988.

MAIA, M.; VIEIRA, R. J. Comportamento sexual do caprino. II. Aspectos quanti-qualitativos do sêmen no período pós-puberal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.16, n.1/2, p.23-32, 1992.

McCOOL, C. J.; ENTWISTLE, K. W.; GILHAM, M. P. Testis growth rates in the Australian Swamp buffalo. **Buffalo Journal**, v.1, p.29-36, 1985.

MEIJER, J. C.; FENTENER, J. M. Gross structure and development of reproductive organs. In: KING, G.J. **Reproduction in Domesticated Animals**. World Animal Science - B9, Amsterdam:Elsevier Science Publishers, 1993. p.9-26.

MIEUSSET, R. et al. Effects of heating the testis and epididymites of ram by scrotal insulation on fertility and embryo mortality in ewes inseminated with frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.94, n.2, p.337-344, 1992.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A.; ARAÚJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30 n.6, Viçosa, p.1704-1711, nov./dez, 2001.

MUCCIOLO, R. G.; BARBABÉ, R. C.; BARNABÉ, V. H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos à degeneração testicular experimental. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.11, p.155-177, 1974.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 108p.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L., 2003. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. 137p.

O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrinology Review**, v. 22, n. 3, p.289-318, 2001.

OHASHI, O. M.; NUR, H. M. Experimental testicular degeneration in bulls. In: SWEDISH INTERNATIONAL POSTGRADUATE COURSE ON ANIMAL REPRODUCTION, 16. **Proceedings** College of Veterinary Medicine, Sweden, v. III, 1985.

OHASHI, O. M. et al. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *Bos taurus* e mestiços, criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.8, p.31-35, 1988.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial de Bubalinos. In: \_\_\_\_\_ **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002.

OHASHI, O. M. et al. Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.299-306, jul./set. 2007. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

ORTIZ PEÑA, C. D.; QUEIROZ, S. A.; FRIES, L. A. Comparação entre critérios de seleção de precocidade sexual e a associação destes com características de crescimento em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.93-100, 2001.

PANETO, J. C. C. et al. Estudos de características quantitativas de crescimento dos 120 aos 550 dias de idade em gado Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.668-674, 2002.

PERERA, O. et al. Buffalo. Cameo-Projects to help resource-poor buffalo keepers in Sri Lanka and Brazil. **Livestock and Wealth Creation**, Cap.23, p.451- 471, 2005.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal** – editora F. E. P. –MVZ; 493P.; Belo Horizonte, 1999.

PEZZINI, T. G. et al. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.863-868, maio 2006.

PLOEN, L. An electron microscope study of the delayed effects on rabbit spermateliosis following experimental cryptorchidism for twenty-four hours. *Virschows arch. **Veterinary Pathology***, n. 14, p. 159 – 184, 1973.

RAO, A. R., BANE, A., GUSTAFSSON, B. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v.14, p.1-12, 1980.

RAO, A. R.; BANE, A. Incidence of sperm abnormalites in infertile bulls with testicular degeneration. **Indian Veterinarian Journal**, v.62, p.46-9, 1985.

RHINES, W. E.; EWING, L. L. Testicular endocrine function in Hereford bulls exposed to high ambient temperature. **Endocrinology**, n.2, v.92, p.509-15, 1973.

RIBEIRO, H. F. L. (1996). **Puerpério in the búfala (*Bubalus bubalis*):** Clinical aspects and histológicos of the uterine involução and ovarian activity. Belo Horizonte. School of Veterinary of UFMG, 125p. (Tese).

ROCA, J. et al. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.29, n.3/4, p.255-262, 1992.

ROSS, A. D.; ENTWISTLE, K. W. The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and epididymal passage of spermatozoa in the bull. **Theriogenology**, n. 11, p. 111- 129, 1979.

SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. 9, p.1835-1841, 2000.

SARTORI, R. et al. Avaliações ultra-sonográfica, macroscópica e histológica da biopsia testicular em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.54 n°.3, Belo Horizonte, Junho, 2002.

SETCHELL, B. P. The parkers lecture - heat and the testis. **Journal Reproduction Fertility**, 114:179-194, 1998.

SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 81-91, 2006.

SHARPEL, R. M. Paracrine control of the testis. **Clinical Endocrinology Metabolism**, n.1, v.15, p.185-207, 1986.

SILVEIRA, T.S. **Estádio de maturidade sexual e estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de características reprodutivas e ponderais, em touros da raça Nelore**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa - MG, 2004.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, 21:1784-1790, 1966.

SIMPLÍCIO, A. A. et al. Puberdade em caprinos da raça Moxotó no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.12, n.2, p.121-126, 1988.

SMITH, B. A.; BRINKS, J. S.; RICHARDSON, G. V. Estimation of genetic parameters among breeding soundness examination components and growth traits in yearling bulls. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2892-2896, 1989b.

SOUSA, H. L. L. **Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Nordeste do Estado do Pará**. 2006. Monografia (TCC em Reprodução Animal) - Coordenadoria do curso de Medicina Veterinária, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará.

STANBENFELD, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A., 1996. Cap. 35, p. 603-614.

STONE, B. A. Heat induced infertility of boars: The inter-relationship between depressed sperm output and fertility and an estimation of the critical air temperature above which sperm output is impaired. **Animal Reproduction Science**, n. 4, p. 283-299, 1982.

THOMSON, R. G. **Patologia Veterinária Especial**. São Paulo: Manole, 1990. p.695- 740.

TRONCOSO, E. U. **Tolerância ao calor em touros da raça Simental e sua relação com a qualidade de sêmen**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, p. 82, 1997.

VALE FILHO, V. R. et al. **Patologia do sêmen; diagnóstico andrológico e classificação de Bos taurus e Bos indicus quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil** - de um estudo de 1088 touros. São Paulo: Dow Química, 1979. 54p.

VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em touros: Parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 35, p.81 – 87, 2001.

VALE, W. G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. **Proceedings...** Belém, Brasil. Belém:APCB. p. 156-171.

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

VALE, W. G. Avaliação andrológica do macho bubalino. **Revista de Ciências Agrárias**. Belém, n.43, jun/jul., 2005. Suplemento.

VALE, W. G. et al. Selection and breeding soundness evaluation in the male buffalo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.141-155, 2008. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

VALE, W. G. et al. Relationship of age, bodyweight and scrotal circumference in Murrah Buffalo bulls. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2. **Proceedings...**Maracaibo, Venezuela, 2001.

VAN CAMP, S. D. Common causes of Infertility in the bull. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, p.203-232, 1997.

VASCONCELOS, C. O. P. **Estádio de maturidade sexual em touros da raça Nelore, dos 20 aos 22 meses de idade**. 2001. 59p. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2001.

VILAR FILHO, A. C. et al. Características testiculares e seminais de caprinos na região semi-árida do Estado da Paraíba. I. Características testiculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.17, n.1/2, p.17-22, 1993a.

VILAR FILHO, A. C. et al. Características testiculares e seminais de caprinos na região semi-árida do estado da Paraíba. II. Características seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.17, n.1/2, p.23-32, 1993b.

VILLARES, J. B. Bioclimatologia da reprodução animal. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2. 1976, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.192-215, 1976.

VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P.; WHITE, I. G. The effects of heat on the metabolism and ultrastructure of ram testicular spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, n. 24, p.71-80, 1970.

WAITES, G. W. H.; SETCHELL, B. P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G. E. **Marshall's Physiology of Reproduction**. 1ed., Londres: Churchill Livingstone, 4ed. v.2, 1990. p. 1-105.

WAITES, G. M. H. 1970. Temperature regulation and the testis. In: JOHNSON, A. D., GOMES, W. R., VANDERMARK, N. L. (Eds.) **The testis**. New York: Academic Press. p.241-279.

WENKOFF, M. S. **The evaluation of bulls for breeding soundness**. Ontário, Canadá: Canadian Veterinarian Medical Association, pp. 48, 1988.