

UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS TRÓPICOS
ANA CLARA FERREIRA BATISTA

**INFLUÊNCIA DO CONFORTO TÉRMICO SOBRE CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS DE TOUROS GIR LEITEIRO DURANTE A PROVA DE PRÉ-
SELEÇÃO**

UBERABA - MG
2021

ANA CLARA FERREIRA BATISTA

**INFLUÊNCIA DO CONFORTO TÉRMICO SOBRE CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS DE TOUROS GIR LEITEIRO DURANTE A PROVA DE PRÉ-
SELEÇÃO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini

UBERABA - MG

2021

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central

UNIUBE

B32i	<p style="text-align: center;">Batista, Ana Clara Ferreira.</p> <p>Influência do conforto térmico sobre características reprodutivas de touros gir leiteiro durante a prova de pré-seleção / Ana Clara Ferreira Batista. – Uberaba, 2021. 50 f. : il. p&b.</p> <p style="text-align: center;">Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação. Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos. Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini.</p> <p style="text-align: center;">1. Gir (Zebu). 2. Sêmen. 3. Bovinocultura. I. Vasconcelos, André Belico de. II. Venturini, Guilherme Costa. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD</p> <p>636.291</p>
------	---

ANA CLARA FERREIRA BATISTA

INFLUÊNCIA DO CONFORTO TÉRMICO SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS
DE TOUROS GIR LEITEIRO DURANTE A PROVA DE PRÉ-SELEÇÃO

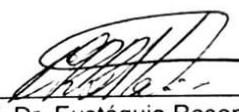
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 24/11/2021

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos - Orientador
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar
Universidade de Uberaba


Profª. Drª. Monique de Albuquerque Lagares
Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos por toda a paciência, colaboração, apoio e confiança depositada em mim.

À Universidade de Uberaba (UNIUBE) pela minha conquista do título de Mestre.

À Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro (ABCGIL) pelo fornecimento dos dados dos exames andrológicos e às Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU) por permitir o acompanhamento do experimento em sua Fazenda Escola durante uma pandemia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti e ao Prof. Dr. Bruno Nassif Travençolo pelo apoio nas análises computacionais de imagens.

À toda a equipe de colegas e colaboradores da Fazenda Escola que se disponibilizaram a conduzir o experimento conosco. Sem vocês nada seria possível!

A realização deste trabalho marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para esta concretização.

“Muita gente prefere não acreditar que os animais têm emoções. Acho que as emoções dessas pessoas estão bloqueando a lógica”.

(Temple Grandin)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do conforto térmico sobre parâmetros seminais padrão e características morfométricas de cabeças de espermatozoides de touros jovens da raça Gir Leiteiro divididos em dois grupos. Foram utilizados dados de 42 touros divididos em duas classes de idade: Grupo A (18 a 25 meses) e Grupo B (26 a 31 meses). Dados meteorológicos foram adquiridos por meio da estação meteorológica automática da cidade de Uberaba e foram aplicados para caracterização ambiental e para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) no dia em que os animais chegaram ao local do experimento (T0), 20 dias após o T0 (T20) e 65 dias após o T0 (T65). Os animais foram avaliados quanto ao perímetro escrotal (PE), qualidade espermática e morfometria das cabeças dos espermatozoides por meio de duas coletas de sêmen por eletroestimulação com intervalo de 45 dias (T20 e T65). Foram determinadas a classificação andrológica por pontos (CAP) e escore de condição corporal (ECC). Para caracterização dos grupos foi realizado o teste T não pareado para comparação dos dois grupos e para análise da correlação entre PE e idade foi realizada a Correlação de Pearson ambos com o programa Graphpad Prism 6.0®. Para caracterização do ambiente foi realizada estatística descritiva. Para análise dos parâmetros seminais e morfométricos das cabeças dos espermatozoides foi realizado Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey a 5% de significância. O coeficiente de correlação entre PE e idade foi de 0,48. As diferenças significativas encontradas ($P < 0,05$) foram: PE foi menor no grupo A ($30,62 \pm 2,57$ cm) que o B ($32,57 \pm 2,34$ cm); Índice de Temperatura e Umidade maior no T20 que os outros dias avaliados; foi observada motilidade menor no Grupo B (T20) $70,71 \pm 10,76\%$ e (T65) $69,05 \pm 17,29\%$ que no Grupo A (T20) $57,38 \pm 22,45\%$ e (T65) $54,29 \pm 29,08\%$; o percentual de defeitos menores foi inferior no Grupo A (T20) $3,43 \pm 3,25\%$ comparado ao B (T65) $10,19 \pm 9,73\%$; a área da cabeça foi menor no Grupo A (T20) $10,07 \pm 0,58 \mu\text{m}$ e no Grupo B (T20) $9,82 \pm 0,59 \mu\text{m}$ comparado ao Grupo A (T65) $10,52 \pm 0,42 \mu\text{m}$ e Grupo B (T65) $10,33 \pm 0,69 \mu\text{m}$. O perímetro do Grupo A (T65) $10,61 \pm 0,27 \mu\text{m}$ foi maior que o Grupo A (T20) $10,33 \pm 0,32 \mu\text{m}$ e Grupo B (T20) $10,27 \pm 0,34 \mu\text{m}$. A largura do Grupo A (T65) $2,12 \pm 0,06 \mu\text{m}$ e do Grupo B (T65) $2,09 \pm 0,07 \mu\text{m}$ foi maior que o Grupo B (T20) $2,03 \pm 0,07 \mu\text{m}$. O comprimento do Grupo A (T65) $4,11 \pm 0,14 \mu\text{m}$ foi maior que o Grupo B (T20) $3,97 \pm 0,13 \mu\text{m}$. E Fourier 3 do Grupo B (T20) $70,01 \pm 4,37$ foi menor que o Grupo A (T20) $75,45 \pm 6,01$ e (T65) $75,96 \pm 5,06$. Conclui-se que a raça apresenta adaptabilidade para as referências andrológicas quanto as questões ambientais.

Palavras-chave: ITU. Machos. Sêmen. Zebu.

ABSTRACT

The objective of this paper was to evaluate the influence of thermal comfort on standard seminal parameters and morphometric characteristics of sperm heads from young Gir Leiteiro bulls divided into two groups. Data from 42 bulls divided into two age classes were used: Group A (18 to 25 months) and Group B (26 to 31 months). Meteorological data were acquired through the automatic weather station in the city of Uberaba and were applied for environmental characterization and for calculating the temperature and humidity index (ITU) on the day the animals arrived at the experiment site (T0), 20 days after T0 (T20) and 65 days after T0 (T65). The animals were evaluated for scrotal circumference (SP), sperm quality and morphometry of the sperm heads by means of two semen collections by electrostimulation with an interval of 45 days (T20 and T65). The andrological classification by points (CAP) and body condition score (BCS) were determined. To characterize the groups, the unpaired T test was performed to compare the two groups and to analyze the correlation between PE and age, Pearson's Correlation was performed, both with the Graphpad Prism 6.0® program. Descriptive statistics were used to characterize the environment. To analyze the seminal and morphometric parameters of the sperm heads, Analysis of Variance (ANOVA) was performed followed by Tukey's test at 5% significance. The correlation coefficient between PE and age was 0.48. The significant differences found ($P < 0.05$) were: PE was smaller in group A (30.62 ± 2.57 cm) than in group B (32.57 ± 2.34 cm); Temperature and Humidity Index higher in T20 than the other evaluated days; lower motility was observed in Group B (T20) $70.71 \pm 10.76\%$ and (T65) $69.05 \pm 17.29\%$ than in Group A (T20) $57.38 \pm 22.45\%$ and (T65) $54.29 \pm 29.08\%$; the percentage of minor defects was lower in Group A (T20) $3.43 \pm 3.25\%$ compared to B (T65) $10.19 \pm 9.73\%$; the head area was smaller in Group A (T20) $10.07 \pm 0.58 \mu\text{m}^2$ and in Group B (T20) $9.82 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$ compared to Group A (T65) $10.52 \pm 0.42 \mu\text{m}^2$ and Group B (T65) $10.33 \pm 0.69 \mu\text{m}^2$. The perimeter of Group A (T65) $10.61 \pm 0.27 \mu\text{m}$ was greater than that of Group A (T20) $10.33 \pm 0.32 \mu\text{m}$ and Group B (T20) $10.27 \pm 0.34 \mu\text{m}$. The width of Group A (T65) $2.12 \pm 0.06 \mu\text{m}$ and of Group B (T65) $2.09 \pm 0.07 \mu\text{m}$ was greater than that of Group B (T20) $2.03 \pm 0.07 \mu\text{m}$. The length of Group A (T65) $4.11 \pm 0.14 \mu\text{m}$ was greater than that of Group B (T20) $3.97 \pm 0.13 \mu\text{m}$. And Fourier 3 of Group B (T20) 70.01 ± 4.37 was lower than Group A (T20) 75.45 ± 6.01 and (T65) 75.96 ± 5.06 . It is concluded that the breed presents adaptability to andrological references regarding environmental issues.

Keywords: Males. Semen. THI. Zebu.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

Figura 1. Correlação entre perímetro escrotal (cm) e idade (meses).....	38
Figura 2. Caracterização ambiental. T0 (dia que os animais chegaram para a adaptação). T20 (20 dias após a adaptação dos animais). T65 (65 dias após a adaptação dos animais).....	38

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Caracterização dos grupos A e B (média \pm desvio padrão).....	37
Tabela 2. Parâmetros seminais do exame andrológico (média \pm desvio padrão).....	39
Tabela 3. Análise de parâmetros morfométricos de cabeças de espermatozoides (média \pm desvio padrão).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

–	Subtração
%	Porcentagem
()	Parênteses
/	Divisão
+	Adição
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
±	Mais ou Menos
®	Marca Registrada
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
x	Multiplicação
ABCGIL	Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro
ACGZ	Associação dos Criadores Gaúchos de Zebu
AT	Azul de Toluidina
CAP	Classificação Andrológica por Pontos
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
Cm	Centímetros
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECC	Escore de Condição Corporal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
Ha	Hectare
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HHG	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ITU	Índice de Temperatura e Umidade
Kg	Quilogramas
LH	Hormônio Luteinizante
PE	Perímetro Escrotal
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNMGL	Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir Leiteiro
TA	Temperatura Ambiental
TA méd.	Temperatura Ambiental Média
TA méd. máx,	Temperatura Ambiental Média Máxima
UR	Umidade Relativa
UR méd.	Umidade Relativa média
URc	Umidade Relativa Corrigida

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Bovinocultura de Leite	14
2.2 Seleção andrológica de machos bovinos	15
2.3. Fertilidade de machos bovinos	16
2.4 Fatores que afetam a fertilidade de machos bovinos	18
2.5. Conforto e estresse térmico	19
2.6. Efeito do estresse térmico sobre a reprodução	21
2.7. Métodos de avaliação	22
2.7.1. Análise macro e microscópica	23
2.7.2. Índice de Temperatura e Umidade (ITU)	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 - Objetivo geral	27
3.2 - Objetivos específicos	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	33
Influência do conforto térmico sobre a qualidade seminal e morfometria da cabeça de espermatozoides de touros Gir Leiteiro (Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.)	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
Introdução	35
Material e Métodos	36
Resultados	37
Discussão	40
Conclusão	42
Referências	42
ANEXO A - Protocolo de Aceite do Comitê de Ética no Uso de Animais	45
ANEXO B - Diretrizes para preparar o manuscrito – Arq. Bras. Med. Vet. Zootec	46

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o IBGE (2020), em 2019 o rebanho bovino brasileiro alcançou o ponto de 214,7 milhões de cabeças de gado, mantendo o país com o segundo maior rebanho bovino do mundo. Juntamente com esses dados, a produção de leite de vaca também cresceu nesse mesmo ano chegando a 34,8 bilhões de litros, o que pode ser explicado pelo aumento da produtividade, já que o Brasil detém o total de 16,3 milhões de vacas ordenhadas.

Uma forma de aumentar a produtividade do rebanho é utilizar machos geneticamente superiores e com comprovada fertilidade (GUIMARÃES et al., 2011). Para essa última, touros selecionados por meio de exame andrológico são capazes de proporcionar elevado retorno econômico e benefício em índices zootécnicos (ALMEIDA et al., 2020).

A Classificação Andrológica por Pontos (CAP) permite classificar touros em quatro classes (aptos, questionáveis, inaptos e em imaturos) por meio de pontos atribuídos com base em características reprodutivas (motilidade espermática, morfologia espermática e perímetro escrotal; FOLHADELLA, 2006; GUIMARÃES et al., 2011), fazendo dela uma alternativa para otimizar a seleção de touros melhoradores.

Esse sistema de classificação por pontos é vastamente utilizado em programas de melhoramento genético. Porém, pouco é avaliada a influência que o fator ambiental pode causar sobre características seminais dos touros avaliados, já que a qualidade seminal pode ser reduzida quando ocorre momentos de estresse térmico. Pois altas temperaturas e insolação escrotal podem afetar a espermatogênese o que causa queda da motilidade progressiva e aumento das anormalidades espermáticas (QUEIROZ et al., 2015).

No caso da bovinocultura, a eficiência reprodutiva é um dos aspectos importantes, visando lucratividade, de um sistema produtivo. Por esse motivo é importante o conhecimento sobre aspectos que englobam a avaliação da qualidade seminal dos touros, bem como a influência que os mesmos podem sofrer por conta de fatores climáticos, a fim de atribuir a verdadeira seleção de animais superiores e bem adaptados ao clima tropical como touros melhoradores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bovinocultura de Leite*

A produção de leite formal no Brasil em 2019 foi de 25.010 milhões de litros de leite e a disponibilidade líquida total de leite foi de 35.489 milhões de litros (EMBRAPA, 2020). Porém, a produção e a produtividade da atividade leiteira no Brasil tende a crescer com a redução do tamanho das propriedades produtoras e com incremento do número de animais em produção por propriedade. Tal fato pode ser confirmado por Vilela et al. (2017) que afirma que as projeções para 2025 são de 39 milhões de litros de leite produzidas.

Entretanto, estudos atentam sobre os limites de recursos de produção, sinalizando que nos próximos 50 anos apresentarão dificuldades para expandir a produção agrícola mundial e exigirá estratégias inovadoras e avanços científicos (VILELA et al., 2017).

Um dos avanços científicos que pode ser citado é o uso de animais adaptados às condições climáticas tropicais para aumentar a produção de leite no Brasil. Para isso, o uso de genótipos lucrativos, principalmente os que além de acrescentar a produção de leite se associam a características funcionais, se torna viável pois permitem produzir leite com baixo custo, além de alta lucratividade e rentabilidade (XIMENES; MARTINS, 2018).

Wenceslau et al. (2000) afirmam que na pecuária leiteira no Brasil a participação de raças zebuínas é significativa devido ao grande número de rebanhos zebus e azebuados com foco em produção de leite, principalmente da raça Gir Leiteiro, a qual é muito utilizada para cruzamentos com raças europeias especialmente leiteiras, obtendo mestiços.

A raça Gir Leiteiro apresenta perfil ultra convexo, fronte larga, marrafa jogada para trás, não apresentando nimbure (saliência ou crista óssea) e chanfro reto. A boca é grande, o focinho, cílios e olhos são de pigmentação escura e o último em formato elíptico. As orelhas são de tamanho médio, pendentes e de início começam encartuchadas, abrem para fora, curvam para dentro na ponta e são voltadas para a face. Os chifres são simétricos, grossos na base, saem para baixo e para trás, de forma elíptica se voltam para cima e se curvam para dentro e são escuros. A pele é preta ou escura para proporcionar tolerância a radiação solar e o pelo é fino e curto. Além disso, a raça produz um leite muito apreciado pela indústria de laticínios por apresentar alta porcentagem de gordura e proteína (ABCGIL, 2014).

O Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir Leiteiro (PNMGL) é um dos fatores base para a evolução da genética dessa raça no Brasil, visando identificar e selecionar touros geneticamente superiores para características de produção e avaliar a genética dos

animais dos rebanhos participantes. O PNMGL é realizado pela Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro em conjunto com a Embrapa Gado de Leite (ACGZ, 2012).

A partir do ano de 2009 uma nova etapa do PNMGL se iniciou: a Prova de Pré-Seleção de Touros para o Teste de Progênie. Nessa prova características reprodutivas relacionadas a produção comercial de sêmen dos touros candidatos ao teste de progênie, temperamento, libido e características de conformação são avaliadas. Esta etapa tem como objetivo construir um banco de dados para características reprodutivas de machos Gir Leiteiro para posteriores estudos de associação entre genética e características reprodutivas, produtivas e de vida útil. Dessa forma, elevará a acurácia e a aplicabilidade para a seleção da raça (FERNANDES et al., 2021).

2.2 Seleção andrológica de machos bovinos

As características quantitativas são usadas para reconhecer a capacidade reprodutiva de machos bovinos, sendo elas: medidas testiculares e qualidade do sêmen. Dentro de medidas testiculares, o perímetro escrotal é o parâmetro mais utilizado em programas de seleção para prever características quantitativas e qualitativas do sêmen e características morfofisiológicas dos testículos, se tornando um indicativo para de precocidade sexual (GUIMARÃES et al., 2011).

Por outro lado, o exame andrológico é o principal recurso utilizado para garantir a fertilidade juntamente com o melhoramento genético de bovinos, por consequência o touro é responsável por mais de 90% do potencial genético de um rebanho (CHAVES et al., 2007).

Esse exame é caracterizado pela avaliação clínica do animal, do perímetro escrotal e avaliação do sêmen (motilidade, vigor, concentração, turbilhonamento e morfologia) e o perímetro escrotal para que seja considerado normal para a reprodução em zebuínos deve apresentar no mínimo 30 cm durante maturidade sexual. (FOLHADELLA et al., 2006).

Outro critério de seleção de touros é o teste de comportamento de libido e capacidade de serviço para indicar se o animal é capaz ou não de se acasalar. Porém, o teste de libido não é capaz de prever a fertilidade individual do touro, o que gera a necessidade de padronização dos testes para comparar e validar a libido entre os touros avaliados. No mais também é necessário adequar os critérios de pontuação destes testes de acordo com as diferenças comportamentais entre bovinos taurinos e zebuínos (SILVA et al., 2015).

É possível observar que o potencial reprodutivo de um touro é o conjunto de vários fatores relacionados a reprodução, tornando possível propor distintos sistemas de pontuação que agem como padrão para seleção andrológica (RONDA et al., 2019).

Touros selecionados por meio do exame andrológico promovem maior retorno econômico e melhora dos índices produtivos, sendo esse acréscimo de 6% em fertilidade para animais que foram aprovados na avaliação andrológica (ALMEIDA et al., 2020).

Desta forma, a Classificação Andrológica por Pontos (CAP) é um desses sistemas, uma vez que possibilita a classificação em aptos, questionáveis, inaptos e em imaturos e apresenta eficiência em selecionar touros zebus a partir de dois anos de idade (FOLHADELLA et al., 2006).

Assim, os programas de melhoramento genético buscam alcançar a seleção destes animais a fim de demonstrar a precocidade sexual, já que nessa fase todos os órgãos reprodutivos recebem transformação estrutural, pelo início da produção de espermatozoides pelas concentrações de hormônios masculinos nas gônadas (GUIMARÃES et al., 2011).

Esse dado comprova a importância da seleção de touros com alto potencial reprodutivo e geneticamente superiores para incremento de melhores índices zootécnicos, devido a fertilidade do rebanho está relacionada a quantidade de fêmeas inseminadas (OLIVEIRA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2011).

Contudo, é preciso considerar que nem todo touro apresentado como satisfatório está apto a reprodução (ALMEIDA et al., 2020). Isso se deve a cerca de 40% de touros inférteis e subférteis estarem sendo utilizados devido a fatores como baixo percentual de espermatozoide com integridade de membrana plasmática e fatores bioquímicos, como a qualidade do DNA do espermatozoide (RONDA et al., 2019).

2.3. Fertilidade de machos bovinos

A espermatogênese é a totalidade dos eventos que ocorrem nos testículos para a produção de espermatozoides. Portanto, é uma série de divisões celulares consecutivas que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos, onde uma célula germinativa diploide se transforma em um gameta masculino haploide. Esse processo tem uma duração média de 60 dias (ARRUDA et al., 2015).

É de fundamental importância o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento testicular e ponderal e dos fatores que podem influenciar a capacidade da produção espermática e a precocidade sexual (MELLO et al., 2016).

A circunferência escrotal aumenta de acordo com idade e peso do animal até que alcance a puberdade, quando se inicia a vida reprodutiva do animal com o início da espermatogênese, aparecimento da libido, liberação do pênis, do frênulo prepucial e ejaculado com no mínimo 50 milhões de espermatozoides e 10% de motilidade progressiva (ASSUMPÇÃO et al., 2013). Após esse acontecimento seu desenvolvimento é mais lento indicando a maturidade sexual, representada por alterações quantitativas e qualitativas do sêmen e com níveis de testosterona que se estabilizam entre 16 a 20 semanas após a puberdade. Nesse estágio o ejaculado apresenta 50% de motilidade progressiva, defeitos espermáticos maiores no máximo de 10% e defeitos espermáticos menores de no máximo 20%. Isso mostra que a atividade reprodutiva está diretamente ligada aos testículos, já que são responsáveis pela espermatogênese e pela produção de andrógenos, principalmente a testosterona (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

É possível avaliar a fertilidade de touros por meio de características fenotípicas do animal e do sêmen. Um exame clínico do indivíduo juntamente com um espermiograma faz parte da seleção reprodutiva (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

Órgãos genitais externos são examinados por palpação e inspeção e os internos por palpação retal. Nesse exame o objetivo é observar a simetria, dimensões, consistência e se são compatíveis com a idade, raça e desenvolvimento do animal (MARIANO et al., 2015).

A análise do pênis e do prepúcio é realizada por inspeção e palpação e pela identificação de lesões, aderências ou fibromas e fibroses que dificultam a exposição do pênis. A avaliação dos cordões espermáticos, saco escrotal, testículo e epidídimos também é realizada pela palpação. Avaliar os cordões espermáticos é importante, pois auxilia o mecanismo de termorregulação testicular. No saco escrotal são observados a presença de cortes, parasitas, cicatrizes, dentre outras alterações. Já nos testículos e epidídimos alterações podem interferir na produção, na maturação e armazenamento espermático (PELLEGRIN et al., 2009).

Como exame laboratorial é considerado a análise de sêmen e para que isso ocorra existem diferentes tipos de colheita de sêmen que devem ser avaliadas de acordo com o objetivo da colheita. A colheita com vagina artificial é amplamente usada para o congelamento de sêmen, principalmente pela concentração do ejaculado que permite maior número de doses de sêmen congelada. O eletroejaculador é utilizado para colheita de touros a campo, mas também é usado para congelamento. A massagem das ampolas dos ductos

deferentes e vesículas seminais é usada em touros jovens em seu primeiro exame clínico, mas também pode ocorrer antes da colheita com o eletroejaculador (PELLEGRIN et al., 2009).

Segundo Ferreira (1993) touros que não são considerados normais em razão de problemas nos testículos, epidídimo, cordão espermático, próstata, vesícula seminal e bolsa escrotal podem apresentar também problemas como aspermia (ausência de ejaculação), oligospermia (baixa concentração de espermatozoides no ejaculado), necrospermia (espermatozoides mortos ou com baixa vitalidade), ou azoospermia (ausência de espermatozoides no ejaculado).

2.4 Fatores que afetam a fertilidade de machos bovinos

A produção seminal depende de vários fatores que podem ou não estar relacionados para que todo o processo ocorra de forma eficaz.

Fatores como estado nutricional, idade, genética, clima e alimentação podem influenciar a produção e a qualidade do sêmen (MELLO et al., 2016).

A subnutrição diminui a secreção do hormônio luteotrófico (LH) e o controle do feed back negativo pela testosterona no hipotálamo para a liberação do hormônio gonadotrófico (GnRH), o que altera a função testicular. Quando a subnutrição é grave ocorre a redução do peso vivo e testicular que pode refletir na taxa de gestação da próxima estação de monta, visto que animais subnutridos demoram por volta de quatro meses para se recuperar (MELLO et al., 2016).

Todavia, animais obesos apresentam menor libido, capacidade de monta e fertilização da fêmea, o que pode fazer com que manifestem condição de subfertilidade (AZEVEDO, 2007). O excesso de gordura subcutânea pode se acumular no cordão testicular o que afeta a termorregulação do plexo pampiniforme, acarretando hipertermia, redução da concentração de testosterona intratesticular, a reserva epididimária e aumento das anormalidades espermáticas (MELLO et al., 2016).

Animais mais jovens apresentam maior libido e, conseqüentemente, maior quantidade de montas por serviço e gastam mais energia na tentativa de montar as fêmeas, embora finalizem uma pequena porcentagem das montas. Porém, uma pequena quantidade das fêmeas que foram realmente cobertas fica gestantes, indicando um problema de fertilidade de touros mais jovens (BEEFPOINT, 2003).

Touros zebuínos apresentam um comportamento que exige menor esforço físico quando encontram uma fêmea receptiva quando comparado aos animais europeus. Isso sugere

que animais mais adaptados utilizem recursos diferentes que permitem um menor desgaste durante o cortejo e a monta. Touros europeus menos adaptados ao clima tropical se desgastam mais rapidamente durante a estação de monta e debilitam até reduzir sua vida útil (MELLO et al., 2016).

A alta produção e menor capacidade de dissipar calor é o fator primordial responsável pela redução da fertilidade dos animais em ambientes tropicais. A dificuldade da termorregulação testicular afeta a fertilidade dos machos bovinos. Animais zebuínos apresentam várias características que permitem ser mais adaptados, como por exemplo, a menor circunferência escrotal, que possuem menor distância entre o centro e a extremidade e permite a dissipação do calor de forma eficiente (BEEFPOINT, 2003).

A alimentação tem um efeito de extrema importância sobre a reprodução. Alimentação com energia restrita causa redução do desenvolvimento testicular e produção espermática, e com longa duração pode causar infertilidade (MELLO et al., 2016). Essa restrição durante a fase de crescimento dos machos pode ocasionar problemas de fertilidade permanentes (BEEFPOINT, 2003). Portanto, deficiência de vitaminas, minerais, proteínas e energia, principalmente em animais em desenvolvimento, pode ter como consequência atrofia e degeneração testicular pela redução da produção de hormônios gonadotróficos (LH e FSH, MELLO et al., 2016).

Além dos fatores citados acima, a presença de ectoparasitas, queimaduras solares ou pelo frio, traumatismo localizados na bolsa escrotal e a exposição da região a radiação e agentes clorados podem provocar disfunções na termorregulação e, conseqüentemente, na espermatogênese (MELLO et al., 2016).

2.5. Conforto e estresse térmico

Como visto anteriormente, a produção de espermatozoides sofre influência do clima, portanto, torna-se necessário o conhecimento sobre conforto e estresse térmico, assim como o estresse térmico pode interferir sobre a fertilidade de machos bovinos.

O clima pode agir de maneira isolada ou em conjunto sobre o comportamento animal, podendo comprometer a produtividade e o bem-estar animal. Para que isso não ocorra os animais possuem uma zona de conforto térmico, na qual para taurinos se encontra entre 0°C e 16°C e para zebuínos entre 10°C e 27°C por serem mais adaptados ao clima tropical. No entanto, temperaturas entre 13°C e 18°C são confortáveis para a maioria dos ruminantes. Essa zona de conforto pode sofrer influência quanto a espécie animal, umidade relativa e

velocidade do ar, estado fisiológico do animal e grau de radiação solar (CATTELAM; VALE, 2013).

Os bovinos são homeotérmicos e por isso conseguem manter sua temperatura interna constante independente da temperatura ambiente. Isso se deve ao sistema termorregulador que esses animais possuem, o qual quando não é necessário, é indício que o animal se encontra dentro da zona de conforto. Para controle da sua temperatura, quando a temperatura ambiente é menor que a superfície corporal o calor passa para o ambiente por processos físicos de radiação, quando o animal entra em contato físico com superfície menos quentes por condução e pelo efeito dos ventos por convecção. Já para controlar a temperatura corporal quando a temperatura do ambiente é mais elevada que a superfície do corpo, o calor pode ser perdido por evaporação pela produção de suor, pela vasodilatação ou evaporação no aparelho respiratório através do aumento do ritmo respiratório e por condução e convecção do interior do organismo do animal (MEDEIROS; VIEIRA, 1997).

Já para realizar o controle da temperatura testicular o escroto apresenta mecanismos que torna mais fácil a termorregulação. A pele escrotal fina, com pouca presença de pelos, com pouca gordura subcutânea e abundante sistema de vasos sanguíneos e linfáticos favorecem a perda de calor. A posição pendular dos testículos possibilita que sejam posicionados afastados da cavidade abdominal, facilitando também a perda de calor. O sistema vascular da região também chamado de plexo pampiniforme rodeia a artéria testicular, realizando a refrigeração do sangue arterial pelo mecanismo de contracorrente (sangue arterial perde calor para o sangue venoso). Além disso, o escroto apresenta estruturas musculares que auxiliam a termorregulação testicular (músculo cremaster e túnica dartos). O músculo cremaster é capaz de contrair para aproximar os testículos da cavidade abdominal durante clima frio, porém, não é eficiente para manter a contração por longos períodos de tempo. A túnica dartos é uma faixa fina de musculatura com movimentação involuntária, a qual contrai ou relaxa dependendo da temperatura ambiental (GARCIA, 2004).

Quando o mecanismo termorregulador não tem capacidade de garantir o equilíbrio térmico provocado pela elevação da temperatura ambiente, ocorre a hipertermia (MEDEIROS; VIEIRA, 1997). Quando as trocas de calor entre animal e ambiente são ineficientes ocorrem casos de estresse térmico (ABREU, 2011). Porém, é preciso considerar que a temperatura corporal é resultado da produção de calor total (calor produzido pelo animal e calor ambiental) menos a capacidade de dissipar esse calor (BARBOSA, 2017).

Utilizar raças geneticamente adaptadas a região ou modificar o ambiente de acondicionamento dos animais para reduzir o efeito do estresse térmico são alternativas para melhorar o desempenho animal (CATTELAM; VALE, 2013).

É necessário considerar que mesmo touros mantidos em Centrais de Inseminação podem sofrer o efeito do clima (QUEIROZ et al., 2015).

2.6. Efeito do estresse térmico sobre a reprodução

Segundo Barbosa (2017) os processos reprodutivos podem ser interrompidos pelo estresse térmico por dois meios: drásticas mudanças na homeostasia para a termorregulação (mudança do fluxo sanguíneo para as áreas periféricas para aumentar a perda de calor) e redução da ingestão de alimentos, a qual reduz o calor metabólico, mas afeta o balanço energético.

As altas temperaturas afetam a espermatogênese e insolação escrotal causa queda da motilidade progressiva e aumento das anormalidades espermáticas (QUEIROZ et al., 2015). Além disso pode causar esterilidade por determinado período, diminuição da produção de sêmen, queda da fertilidade e degeneração do epitélio reprodutivo (MEDEIROS; VIEIRA, 1997).

Fisiologicamente o estresse calórico ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) causando antagonismo entre seus hormônios e os do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Essa inibição ocorre quando há liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, o qual inibe a secreção de GnRH no hipotálamo. Desta forma, reduz a liberação na adenohipófise do FSH e LH. Conseqüentemente, a secreção de hormônios esteroides gonadais é bloqueada. Além disso, durante o estresse térmico os receptores para gonadotrofinas das células gonadais são afetados diretamente causando desequilíbrio hormonal e redução da sensibilidade das células para o LH e FSH (COUTO, 2013).

Para função total do parênquima testicular é necessária uma temperatura por volta de 33°C (MELLO et al., 2016), sendo de 4°C a 7°C abaixo da temperatura corporal (VIEIRA et al., 2018) e qualquer alteração de 0,5°C a 1°C acima do normal desencarreta em hipóxia do tecido testicular e epididimário, interferindo no desenvolvimento da célula espermática. Tal fato ocorre pela alteração do fluxo sanguíneo que eleva o metabolismo e reduz o oxigênio. Além disso, o calor e a hipóxia reduzem a quantidade de LH disponível e, conseqüentemente, de testosterona, afetando a função testicular (MELLO et al., 2016).

Em touros taurinos acondicionados em regiões tropicais a queda da qualidade do sêmen é ainda mais acentuada durante o estresse térmico. Isso não ocorre somente pelo mecanismo de termorregulação ser menos eficiente, mas também pela maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados encontrados na membrana do espermatozoide, predispondo a um intenso estresse oxidativo (SOUTO, 2018).

O estresse térmico afeta também o pH do sêmen e o volume do ejaculado, principalmente de raças europeias e consequências na qualidade do espermatozoide é mais pronunciado durante as primeiras semanas de espermatogênese (MOURA et al., 2011).

Alterações no pH seminal após o estresse térmico testicular pode ser consequência da modificação da composição bioquímica do ejaculado (secreções dos testículos e epididimárias) e também resultado da morte de espermatozoides causada pelo estresse térmico (MOREIRA et al., 2001).

Além disso, o clima afeta a capacidade de desenvolvimento testicular e por decorrência a diminuição de espermatócitos e maturação das espermatídes, devido a redução da capacitação esteroidogênica das células de Leydig, reduzindo a produção espermática (OLIVEIRA et al., 2012).

2.7. Métodos de avaliação andrológica

Durante o exame andrológico além das análises das características seminais, algumas características do animal também são avaliadas.

O perímetro escrotal é aferido transversalmente na região de maior diâmetro do escroto com utilização de fita métrica milimetrada, envolvendo as duas gônadas e pele escrotal (GRESSLER et al., 2000; RONDA et al., 2019).

A idade do animal no momento do exame também deve ser considerada. Para isso, a idade geralmente é contada em meses a partir da data de nascimento até o dia da coleta seminal.

O escore de condição corporal é medido se baseando na observação da deposição de gordura na inserção da cauda (MERCADANTE et al., 2006). Para animais de leite a escala utilizada é de 0 a 5, onde 0 é ponto de morte e 5 muito gordo e para animais de corte a escala foi adaptada com valores intermediários para animais dos quais a condição corporal não se encaixa nesses valores, funcionando como uma escala de 11 pontos (EDMONSON et al., 1989).

A aferição da temperatura testicular, superficial e retal não é comumente realizada nesse momento. Porém pode ser utilizada para verificar alterações das características fisiológica dos animais que podem ser afetados pelo estresse térmico (SOUTO et al., 2021). As temperaturas testiculares e superficiais podem ser aferidas com o uso de termografia infravermelha (SOUTO et al., 2021) ou com termômetro infravermelho a laser em diversos locais do animal (BARBOSA et al., 2014). A temperatura retal é aferida com termômetro clínico (BARBOSA et al., 2014; SOUTO et al., 2021).

2.7.1. Análise macro e microscópica do sêmen

Após a colheita do sêmen, é preciso analisá-lo imediatamente quanto às características físicas. São observados volume, aspecto e variáveis cinéticas (turbilhonamento, motilidade e vigor). O volume depende do método de colheita e o aspecto pode ser influenciado pela presença de urina, sangue ou pus. Pode ser classificado em aquoso, leitoso, cremoso-fino, cremoso espesso ou cremoso e apresenta relação com a concentração espermática. O turbilhonamento é a intensidade da onda de movimentação dos espermatozoides e pode variar de 0 a 5, no qual zero é a ausência de movimento em massa e cinco muita movimentação. A motilidade é o número de espermatozoides que apresentam motilidade progressiva em cada 100 espermatozoides observados e são considerados apenas aqueles com motilidade retilínea e progressiva. O vigor também varia de 0 a 5 e é a intensidade com que a célula se desloca no campo do microscópio. Já a concentração é a quantidade de espermatozoides em um volume de ejaculado e varia de acordo com a raça, método de coleta, nutrição, patologias, de indivíduo para indivíduo e estação do ano. A morfologia é dividida em defeitos maiores e defeitos menores (MARIANO et al., 2015).

Para avaliação do volume do ejaculado pode ser utilizada uma proveta graduada (RONDA et al., 2019). A concentração espermática/ml é calculada com o uso de câmara de Neubauer diluindo uma amostra de sêmen em solução formol salina geralmente na proporção de 1:200 contando cinco quadrados da câmara em diagonal (sem contar os espermatozoides com cabeças sobre as bordas laterais esquerdas e inferiores). A concentração espermática/ml é então calculada com uso de uma fórmula, multiplicando por 10.000.000 (BARBOSA et al., 2011). O percentual de espermatozoides com motilidade e o vigor (0-5) é estimado subjetivamente visualmente em porcentagem sob com microscopia óptica (aumento 100 x) com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (ARRUDA et al., 2011). O turbilhonamento

é aferido com microscopia ótica (aumento 100 x) com uma gota de sêmen sobre a lâmina e observada o bordo da gota (0-5).

A morfologia é dividida em defeitos maiores (defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda fortemente enrolada) e defeitos menores. Os defeitos maiores ocorrem durante a espermiogênese, enquanto que os defeitos menores ocorrem após os espermatozoides deixarem o testículo, ou seja, durante a passagem pelo epidídimo e/ou a ejaculação ou manipulação do sêmen. É considerado ideal que o número de espermatozoides com defeitos maiores não ultrapasse 20% e os defeitos totais 30%. Ambas as características são analisadas com microscopia ótica (MARIANO et al., 2015).

A morfologia espermática pode ser analisada utilizando esfregaços corados em microscopia ótica de campo claro ou a técnica de preparação úmida com avaliação em microscopia de contraste e interferência de fase (ARRUDA et al., 2011).

Desta forma para que o espermatozoide seja considerado viável e fértil é preciso que ele apresente membranas, atividade metabólica e morfologia normais. A existência de membranas espermáticas íntegras é fundamental para que ocorram os processos que acompanham a fertilização, como por exemplo, capacitação espermática, penetração nas células do cumulus do ovócito, ligação a zona pelúcida e união com o oolema, possam ocorrer (ARRUDA et al., 2006).

As avaliações de motilidade, vigor, turbilhonamento, concentração/ml e morfologia espermáticas são realizadas desde a década de 80 e apresentam como base técnicas e padrões sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (ARRUDA et al., 2006).

A avaliação da morfologia e motilidade espermáticas são imprescindíveis na análise da qualidade seminal. Contudo, essa análise basicamente é realizada a partir de uma avaliação subjetiva que podem variar de 30% a 60% devido a limitação do ser humano em identificar as subpopulações de espermatozoides (MATOS et al., 2008). Para evitar tal subjetividade, métodos que utilizam testes multiparamétricos para características da cabeça do espermatozoide vêm sendo procurados por pesquisadores. São basicamente, métodos auxiliados por computadores para analisar medidas primárias e derivadas (LUCIO et al., 2016).

Outros métodos de análise seminal são o uso de sondas fluorescentes para avaliar estruturas espermáticas por meio de microscópio de epifluorescência, sistema de citometria de fluxo, avaliação das proteínas do plasma seminal e quantificação da produção de espécies reativas ao oxigênio (ARRUDA et al., 2006).

Também é possível citar os testes de viabilidade da membrana espermática e o teste de resistência osmótica, os quais avaliam as lesões e perda da função das membranas dos espermatozoides ocasionados principalmente pelo processo de resfriamento e congelamento, já que lesões nas membranas espermáticas causam perda de componentes celulares, reduzindo a viabilidade celular e a motilidade após o congelamento. E o teste de termo resistência ou teste de incubação variadas temperaturas e com variação do tempo de exposição avalia a resistência dos espermatozoides ao meio diluidor, ao tempo de duração do teste e à temperatura utilizada. O diluidor, o volume da palheta, a concentração de espermatozoides por dose, o tempo e a temperatura de exposição e a incubação da amostra fora ou dentro da palheta são algumas das variáveis que podem influenciar o resultado desse teste (SEVERO, 2009).

A motilidade e cinética espermáticas do sêmen também pode ser avaliado pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA) que gera informações objetivas sobre um ejaculado pela avaliação individual dos espermatozoides (MAZIERO et al., 2009).

A análise da morfometria espermática pode ser usada para complementar as análises seminais (ARRUDA et al., 2011). Essa técnica permite a correlação entre as medições aferidas por esse sistema e a fertilidade em diferentes espécies (BERGSTEIN et al., 2014). Para isso, é realizado esfregaço e corado e as imagens das cabeças dos espermatozoides destinadas à análise são avaliadas por um software (ARRUDA et al., 2011).

O corante azul de toluidina (AT) é utilizado para identificar alterações de compactação da cromatina e permite também avaliar a morfometria de espermatozoides por delimitar a cabeça (GRUPPI, 2019). Para que isso ocorra é realizado o esfregaço de uma amostra de sêmen em lâmina, fixada, hidrolisada, lavada em água destilada, seca, corada com AT, coberta com lamínula, e imagens das cabeças dos espermatozoides são registradas com microscópio de campo claro com câmera acoplada (MARTINS et al., 2021).

As fotos das cabeças selecionadas são avaliadas por um software e as variáveis morfométricas avaliadas são: área, perímetro, largura, comprimento, média de comprimento/largura, elipsidade, fator de formato, simetria lateral, simetria anteroposterior e harmônicas de Fourier com amplitude de 0 a 2 (KIPPER et al., 2017).

Severo (2009) afirma que não se deve confundir qualidade de sêmen com fertilidade, já que por mais que exista correlação positiva entre as duas, não são sinônimos. O conjunto de vários parâmetros avaliados pode melhor prever a fertilidade de uma amostra de sêmen.

2.7.2. Índice de Temperatura e Umidade (ITU)

O principal modo de aferir a qualidade ambiental onde os animais estão é por meio do Índice de Temperatura e Umidade (ITU). Este índice foi inicialmente desenvolvido para avaliar o conforto térmico em humanos, porém, pesquisadores observaram uma queda da produção de leite de vacas com aumento do ITU (CATTELAM; VALE, 2013).

Esse índice concilia os efeitos da temperatura e umidade. Nos Estados Unidos da América foi usado pela indústria de transporte para oferecer orientações de transporte de gado durante condições de estresse térmico e como componente dessas orientações a Livestock Conservation Inc. desenvolveu o índice de segurança climática para gado tendo como base o ITU (BROWN-BRANDL, 2018).

O cálculo do ITU pode ser feito por meio do modelo imposto por Buffington et al. (1982) citado por Bizinoto (2005), descrito na equação a seguir: $ITU = 0,8 \times TA + UR (TA - 14,3) / 100 + 46,3$ onde, TA corresponde a temperatura do ar (°C) e UR corresponde a umidade relativa do ar (%). Porém, para adaptação da equação para ambientes de clima tropical é utilizada a equação proposta por Campos et al. (2001) citado por Bizinoto (2005): $URc = (TA \text{ méd.} \times UR \text{ méd.}) / TA \text{ méd. máx.}$, onde TA méd. corresponde a temperatura média do ar, UR méd. corresponde a umidade relativa média do ar e TA méd. máx. corresponde a temperatura média das máximas temperaturas do ar, visando corrigir a UR e os intervalos de estresse térmico diário dos animais.

O ITU abaixo ou igual a 74 é considerado condição normal; entre 74 e 79 é crítico; de 79 a 84 é considerado de perigo e acima de 84 é considerado situação de emergência (BROWN-BRANDL, 2018). Animais que se encontram dentro de uma faixa de ITU considerada ótima irão produzir de acordo com seu potencial genético (PERISSINOTTO; MOURA, 2007).

Porém, diversos fatores podem interferir na resposta do animal a um determinado ambiente, como por exemplo, cor da pele, espécie, sexo, saúde e histórico de saúde, temperamento, idade, escore de condição corporal, espessura do pelo e anterior exposição ao ambiente (BROWN-BRANDL, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a influência do conforto térmico sobre a qualidade seminal e morfometria da cabeça dos espermatozoides de touros Gir Leiteiro em duas faixas etárias (de 18 a 25 meses e de 26 a 31 meses).

3.2 - Objetivos específicos

Avaliar a influência do conforto térmico sobre características seminais consideradas padrão (motilidade, vigor e defeitos espermáticos).

Avaliar a influência do conforto térmico sobre características de morfometria das cabeças de espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- ABCGIL. **Características do Gir Leiteiro**. Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro, 2015. Disponível em: < <http://girleiteiro.org.br/?conteudo/150>>. Acessado em: 30 jul. 2021.
- ABREU, Alexandre S. de. **Indicadores do estresse térmico em bovinos**. 2011. Disponível em: https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/abreu_estresse_termico.pdf. Acesso em: 12 jun. 2020.
- ACGZ. **Gir Leiteiro**. Associação dos Criadores Gaúchos de Zebu, 2012. Disponível em: < https://www.acgz.com.br/secao_racas.php?pagina=5>. Acessado em: 30 jul. 2021.
- ALMEIDA, J. de *et al.* Importância da avaliação andrológica na seleção de touros em fazendas de leite. In: RIBEIRO, Júlio César *et al.* **Impacto, Excelência e Produtividade das Ciências Agrárias no Brasil 4**. 4. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. p. 174-185. Disponível em: <https://www.atenaeditora.com.br/post-ebook/3171>. Acesso em: 09 jun. 2021.
- ARRUDA, Rubens Paes de *et al.* Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1. 2006, Londrina. **Biotechnology da Reprodução em Bovinos**. Londrina: Desconhecido, 2006. p. 157-164.
- ARRUDA, Rubens Paes de *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, abr/jun 2011.
- ARRUDA, Rubens Paes de *et al.* Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 47-60, jan/mar 2015.
- ASSUMPÇÃO, T. I. de *et al.* Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 148-154, set. 2013. Editora Cubo. <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.062>.
- AZEVÊDO, D. M. M. R. **Fatores que influenciam a fertilidade em rebanhos bovinos**. Parte 1: nutrição e sanidade. 2007. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/colunistas/coluna/fatores-que-influenciam-a-fertilidade-em-rebanhos-bovinos--parte-1--nutricao-e-sanidade_385155.html>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- BARBOSA, C. P. *et al.* Comparação entre as principais técnicas de análise da concentração espermática em exames andrológicos de touros a campo. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 16, Ed. 163, Art. 1100, 2011.
- BARBOSA, B. R. P. *et al.* Tolerância ao calor em bovinos das raças Nelore branco, Nelore vermelho e Pantaneira. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 15, n. 4, p. 854-865, out/dez. 2014.

BARBOSA, E. A. **Características fisiológicas e seminais de touros da raça localmente adaptadas mantidas com e sem sombreamento**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 73p. Tese de Doutorado.

BEEFPOINT. **Manejo de cuidado com touros**. 2003. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/manejo-e-cuidados-com-touros-7703/>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

BERGSTEIN, T. G. *et al.* Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira em Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 4, p. 189-194, dez. 2014.

BIZINOTO, A. L. **Efeito da ingestão de cromo sobre o ganho de peso e de alguns constituintes sanguíneos de bovinos mantidos em pastagens no cerrado, em Uberlândia, Minas Gerais**. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

BROWN-BRANDL, T. M. Understanding heat stress in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.I.], v. 47, p. 1-9, 29 nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/rbz4720160414>.

BUFFINGTON *et al.* Shade management systems to reduce heat stress for dairy cows. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers, 1982. 16p. (PAPER 82-4061). 409p.

CAMPOS *et al.* Prognóstico de declínio na produção de leite em função do clima para a região de Goiânia, GO. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38., 2001, Piracicaba. Anais eletrônicos..., Piracicaba: 2001.

CATTELAM, J.; VALE, M. M. do. Estresse térmico em bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Santa Maria, v. 588, n. 108, p. 154-160, jan. 2013.

CHAVES, R. M. *et al.* Avaliação da capacidade reprodutiva de touros da raça Nelore através da classificação andrológica por pontos (CAP) e do teste da libido. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p. 26-32, jan. 2007.

COUTO, R. S. **Eficiência reprodutiva de vacas mestiças leiteiras criadas em sistema de criação com e sem sombreamento, em Bujarú, Pará**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

EDMONSON A. J. *et al.* A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal Of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 68-78, 1989.

EMBRAPA. Maior volume de leite inspecionado da década. **Anuário Leite 2020**. Juiz de Fora, p. 28-30. fev. 2020.

FERNANDES, André Rabelo *et al.* **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro 12ª Prova de Pré-Seleção de Touros Touros Pré-Selecionados por Meio de Avaliação Genômica**. Juiz de Fora: Embrapa, 2021. 21 p.

- FERREIRA, A. de M. **Fatores que influenciam a fertilidade do rebanho bovino**. Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA-CNPGL, 1993. 16p. (EMBRAPA-CNPGL. Documentos, 53). Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/590935/fatores-que-influenciam-a-fertilidade-do-rebanho-bovino>>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- FOLHADELLA, I. M. *et al.* Características andrológicas de touros da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 809-815, 2006.
- GARCIA, Alexandre Rossetto. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso de somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (Bos taurus taurus)**. 2004. 260 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal, Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.
- GRESSLER, S. L. *et al.* Estudo das Associações Genéticas entre Perímetro Escrotal e Características Reprodutivas de Fêmeas Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 427-437, 2000.
- GRUPPI, L. J. F. **Avaliação da compactação de cromatina espermática e morfometria da cabeça de espermatozoides de touros zebuínos e taurinos durante estação quente e fria na microrregião de Uberaba, MG, Brasil**. 2019. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- GUIMARÃES, J. D. *et al.* Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 379-388, 2011.
- KIPPER, B.H. *et al.* Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v. 87, p. 154-160, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.017>.
- LUCIO, A. C. *et al.* Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 924-933, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>.
- MARIANO, R. S. G. *et al.* Exame andrológico em bovinos: revisão de literatura. **Nucleus Animalium**, Ituverava, v. 7, n. 1, p. 131-135, maio 2015.
- MARTINS, M. C. *et al.* Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. **Theriogenology**, v. 161, p. 200-209, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004>.
- MATOS, D. L. *et al.* Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, dez. 2008.

- MAZIERO, R. R. D. *et al.* Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 5-10, dez. 2009.
- MEDEIROS, L. F. D.; VIEIRA, D. H. **Bioclimatologia Animal**. Seropédica: Desconhecido, 1997. 126 p.
- MELLO, R. R. C. *et al.* Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 57-63, 1 ago. 2016. Universidade Paranaense.
<http://dx.doi.org/10.25110/arqvet.v19i1.2016.5792>.
- MERCADANTE, M. E. Z. *et al.* Escore de condição corporal de vacas da raça Nelore e suas relações com características de tamanho e reprodução. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Maracaibo, v. 14, n. 4, p. 143-147, 2006.
- MOREIRA, Emerson Pinto *et al.* 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**, Viçosa, v. 6, n. 30, p. 1704-1711, jan. 2001.
- MOURA, M. S. *et al.* Manejo reprodutivo de bovinos na propriedade rural. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 9, Ed. 156, Art. 1055, 2011.
- OLIVEIRA, L. R. S. *et al.* Seleção de touros jovens Nelore por meio de exames zootécnico e andrológico e da eficiência reprodutiva durante uma estação de monta. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 2, n. 3, p. 25-31, jul. 2008.
- OLIVEIRA, M. da S. *et al.* Influência do estresse térmico sobre a reprodução de bovinos de corte. In: VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica, 6, 2012, Maringá. **Anais Eletrônico**. Maringá: Desconhecido, 2012. p. 1-17.
- PELLEGRIN, A. O. *et al.* **Fertilidade, Funcionalidade e Genética de touros Zebuínos**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 211 p.
- PERISSINOTTO, M.; MOURA, D. J. de. Determinação do conforto térmico em vacas leiteiras utilizando mineração de dados. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 117-126, ago. 2007.
- QUEIROZ, V. L. D. *et al.* Sazonalidade na congelabilidade de sêmen bovino. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 18, n. 1, p. 39-47, mar. 2015.
- RONDA, J. B. *et al.* Classificação andrológica por pontos e características andrológicas na avaliação reprodutiva de touros da raça Gir candidatos ao teste de progênie. **Ciência Animal Brasileira**, [S.I.], v. 20, n. [s.I.], p. 1-8, 2019. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v20e-44670>.
- SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, v. 28, n. 167, p. 36-39, fev. 2009.

SILVA, E. V. C. *et al.* Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. **Revista Brasileira em Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 22-31, jan. 2015.

SOUTO, P. L. G. **Relações entre características adaptativas, qualidade espermática e perfil proteico do plasma seminal de touros adaptados à região subtropical**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 113p. Tese de doutorado.

SOUTO, P. L. G. *et al.* Influence of season and external morphology on thermal comfort and physiological responses in bulls from two breeds adapted to a subtropical climate. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 22, p. 1-20, 2021.
<http://dx.doi.org/10.1590/s1519-99402122022021>.

VIEIRA, J. I. T. *et al.* Influência da temperatura sobre a função testicular. **Medicina Veterinária (ufrpe)**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 62, 3 out. 2018. Medicina Veterinaria (UFRPE).
<http://dx.doi.org/10.26605/medvet-v12n1-2153>.

VILELA, D. *et al.* A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, Embrapa, v. 26, n. 1, p. 5, mar. 2017.

WENCESLAU, A. A. *et al.* Estimação de Parâmetros Genéticos de Medidas de Conformação, Produção de Leite e Idade ao Primeiro Parto em Vacas da Raça Gir Leiteiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 153-158, 2000.

XIMENES, L. J. F.; MARTINS, G. A. Bovinocultura Leiteira: melhoramento genéticoeconômico. **Caderno Setorial - Etene**. Passaré, p. 1-18. nov. 2018.

CAPÍTULO II

Influência do conforto térmico sobre a qualidade seminal e morfometria da cabeça de espermatozoides de touros Gir Leiteiro

Influence of thermal comfort on seminal quality and sperm head morphometry of Gir Leiteiro bulls

RESUMO

Os bovinos são animais homeotérmicos e estabelecem de forma fisiológica o controle homeostático, independente da temperatura ambiente. Contudo conforme as características ambientais podem ocorrer alterações no processo da espermatogênese que promovem anormalidades espermáticas. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do conforto térmico sobre parâmetros seminais e características morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros da raça Gir Leiteiro. Foram utilizados 42 touros, divididos em dois grupos conforme a idade: Grupo A (18 a 25 meses) e Grupo B (26 a 31 meses). Os dados meteorológicos usados no experimento foram adquiridos por meio da estação meteorológica automática da cidade de Uberaba e foram aplicados para caracterização ambiental e para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU). As colheitas de sêmen foram definidas conforme o delineamento experimental (tempos da determinação do ITU – T25;T65). Foram coletados dados do perímetro escrotal (PE/cm); viabilidade espermática; escore de condição corporal; classificação andrológica por pontos (CAP); e por fim análise da morfometria das cabeças dos espermatozoides. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e comparação com o teste de Tukey e a probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa. Foi observada correlação positiva entre perímetro escrotal (PE) e idade ($r = 0,48$). O ITU apresentou diferença significativa sendo maior no T20 quando comparado com o T0 e T65 ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para a avaliação de parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides. Todavia área da cabeça foi menor ($P < 0,05$) na comparação dos grupos conforme a idade (Grupo A vs B), para ambos tempos de determinação do ITU. Apesar da significância entre T20 e T65 os ITUs calculados durante o período das águas se encaixam dentro da categoria considerada normal por apresentar pontuação menor que 74. Por mais que os animais se mostrem adaptados ao ambiente, e que a espermatogênese possa ser

influenciada pela regulação da temperatura corporal, a resposta fisiológica do desenvolvimento do animal tem seu papel sobre a condição reprodutiva.

Palavra Chave: Macho, Sêmen, ITU, Zebu

ABSTRACT

Bovines are homeothermic animals and physiologically establish homeostatic control, regardless of ambient temperature. However, depending on the environmental characteristics, there may be changes in the spermatogenesis process that promote sperm abnormalities. The objective of this work was to evaluate the influence of thermal comfort on seminal parameters and morphometric characteristics of the sperm head of Gir Leiteiro bulls. Forty-two bulls were used, divided into two groups according to age: Group A (18 to 25 months) and Group B (26 to 31 months). The meteorological data used in the experiment were acquired through the automatic meteorological station of the city of Uberaba and were applied for environmental characterization and for the calculation of the temperature and humidity index (ITU). The semen collections were defined according to the experimental design (times for the determination of the ITU – T25;T65). Data were collected from the scrotal circumference (PE/cm); sperm viability; body condition score; andrological classification by points (CAP); and finally analysis of the morphometry of the sperm heads. Analysis of variance (ANOVA) and comparison with Tukey's test were performed and the probability of $P < 0.05$ was considered significant. A positive correlation was observed between scrotal circumference (SP) and age ($r = 0.48$). The UTI showed a significant difference, being higher in T20 when compared to T0 and T65 ($P < 0.05$). There was no significant difference ($P > 0.05$) for the evaluation of morphometric parameters of the sperm head. However, head area was smaller ($P < 0.05$) in the comparison of groups according to age (Group A vs B), for both times of UTI determination. Despite the significance between T20 and T65, the UTIs calculated during the wet season fit within the category considered normal for presenting a score lower than 74. As much as the animals are adapted to the environment, and that spermatogenesis can be influenced by the regulation of body temperature, the physiological response of the animal's development plays a role in the reproductive condition.

Keywords: males, semen, THI, zebu

Introdução

Os bovinos são animais homeotérmicos e, portanto, conseguem manter sua temperatura interna constante, independente da temperatura ambiental. Para tal, este controle de temperatura pode ocorrer por evaporação, pela produção de suor, pela vasodilatação ou evaporação pelo aparelho respiratório por meio do aumento do ritmo respiratório e por condução e convecção do interior do organismo do animal (Medeiros e Vieira, 1997).

Animais criados em região de clima tropical tem se mostrado mais adaptados as mudanças climáticas (Cattalam e Vale, 2013).

A raça Gir se originou na Índia, na floresta de Gir, localizada na Península de Kathiawar de ambiente quente e seco, destacando sua capacidade em suportar altas temperaturas (Nascimento *et al.*, 1975; Ximenes e Martins, 2018). Os animais da raça Gir Leiteiro têm se mostrado fisiologicamente promissores as estas condições principalmente pelas características fenotípicas, pele preta ou escura, e pelo fino e curto o que proporciona tolerância a radiação solar (ABCGIL, 2015), aspectos que elevam seu grau de adaptabilidade nas regiões de clima tropical.

O efeito das altas temperaturas nos processos reprodutivos é amplamente discutido, pois o estresse térmico pode promover drásticas mudanças na homeostasia para possibilitar a termorregulação (mudança do fluxo sanguíneo para as áreas periféricas para aumentar a perda de calor, e redução da ingestão de alimentos, a qual reduz o calor metabólico, mas também afeta o balanço energético; Barbosa, 2017)). Como consequência, foram observadas alterações na espermatogênese e aumento das anormalidades espermáticas (Queiroz *et al.*, 2015), o que promove diminuição da produção de sêmen, com queda da fertilidade promovendo uma condição de subfertilidade (Medeiros e Vieira, 1997).

Como forma de prever os efeitos da temperatura ambiental onde os animais estão alocados estabeleceu-se como métrica o momento de avaliação em consonância com os valores de temperatura e umidade, reconhecido como Índice de Temperatura e Umidade (ITU) (Cattalam e Vale, 2013). É um parâmetro estabelecido pela Livestock Conservation Inc. como ponto de avaliação das condições de estresse térmico para o transporte de gado (Brown-Brandl, 2018).

Estudos a campo são realizados para determinar as condições de criação, produção animal, bem como seleção genética por meio da seleção andrológica (Ximenes e Martins, 2018; Ronda *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2020). Portanto, o potencial reprodutivo é o conjunto de diversos elementos relacionados a reprodução a partir dos quais é possível propor diferentes sistemas de classificação por pontos para gerar índices de seleção reprodutiva e auxiliar na

seleção de touros melhoradores (Ronda *et al.*, 2019). A análise da morfometria espermática pode ser usada como técnica complementar às análises seminais a fim de se obter maior acurácia durante a seleção de animais superiores (Arruda *et al.*, 2011).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do conforto térmico sobre parâmetros seminais avaliados rotineiramente, e das características morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros jovens da raça Gir Leiteiro divididos em dois grupos (de 18 a 25 meses e 26 a 31 anos).

Material e Métodos

A pesquisa com o uso de animais foi aprovada pelo comitê de Ética em Experimentação Animal das Faculdades Associadas de Uberaba (protocolo 014/2021).

O experimento foi realizado na cidade de Uberaba, Minas Gerais, Brasil do mês de novembro de 2020 a fevereiro de 2021. Os animais fazem parte da 12ª prova de pré-seleção de touros para o teste de progênie do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (PNMGL).

Foram utilizados 42 touros da raça Gir Leiteiro, os quais tiveram seus dados coletados durante o período experimental divididos em dois grupos conforme a idade: Grupo A (18 a 25 meses, n= 21) e Grupo B (26 a 31 meses, n= 21). As idades foram estabelecidas a partir da data de nascimento até o dia do início do experimento.

Os touros passaram por um processo de adaptação de 20 dias e foram acondicionados em piquetes com capim *Panicum sp.* de manejo em sistema intensivo e com lotação rotacionada preparados para receber sete unidades animais/hectare durante o período das águas. Na área de lazer se encontravam bebedouro com água a vontade e cocho para suplementação mineral a vontade, cocho para suplementação de concentrado e área com sombreamento artificial de 3m² por cabeça. Todos os animais receberam o mesmo manejo alimentar com oferta de 4% matéria seca por 100kg de peso vivo durante o período experimental.

Os dados meteorológicos usados no experimento foram adquiridos por meio da estação meteorológica automática da cidade de Uberaba e foram aplicados para caracterização ambiental e para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) no dia em que os animais chegaram ao local do experimento (T0), 20 dias (T20) e 65 dias (T65), após o T0. O cálculo do ITU foi feito por meio do modelo imposto por Buffington *et al.* (1982) e Campos *et al.* (2001) citados por Bizinoto (2005).

As coletas de sêmen foram realizadas pela técnica de eletroestimulação (boijector 65A, Walmur, Porto Alegre, Brasil). As coletas foram definidas conforme o delineamento experimental, para tal foi definido os tempos da determinação do ITU. Assim foram

realizadas duas colheitas 20 dias (T20) e aos 65 dias (T65) após a adaptação dos animais (T0), total de 84 amostras.

Assim, os animais foram avaliados quanto ao perímetro escrotal (PE/cm), viabilidade espermática (motilidade, vigor, morfologia) por meio de microscopia de campo claro, determinação do escore de condição corporal (ECC, pontos) avaliado conforme proposto por Edmonson *et al.* (1989) para animais de leite e por fim o cálculo da classificação andrológica por pontos (CAP) conforme relatado por Ronda *et al.* (2019).

Uma amostra de sêmen foi utilizada para a análise da morfometria das cabeças dos espermatozoides. A análise foi realizada seguindo a metodologia de Martins *et al.* (2021), adaptada para a obtenção das imagens com o software AxionVision 4.8 (ZEISS, Alemanha) e microscópio óptico (AxioStar Plus, ZEISS, Alemanha) com câmera (AxioCam, ZEISS, Alemanha) acoplada e lente objetiva (aumento de 630 x) com óleo de imersão.

Para caracterização dos grupos foi realizado o teste T não pareado para comparação dos dois grupos e para análise da correlação entre PE e idade foi realizada a Correlação de Pearson, com o programa Graphpad Prism 6.0®. Para caracterização do ambiente e análise dos parâmetros seminais e morfométricos da cabeça dos espermatozoides foi realizada a análise de variância (ANOVA) e comparação com o teste de Tukey e a probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa.

Resultados

Foi realizada a caracterização dos grupos de acordo perímetro escrotal (PE), escore de condição corporal (ECC) e classificação andrológica por pontos (CAP). Não houve diferença dos pontos para ECC e CAP ($P > 0,05$) entre os grupos, no entanto, o PE foi menor ($P < 0,05$) no grupo A ($30,62 \pm 2,57$ cm) que no B ($32,57 \pm 2,34$ cm, Tab. 1).

Tabela 1. Caracterização dos grupos A e B (média \pm desvio padrão).

Características	Grupo A (18 a 25 meses)	Grupo B (26 a 31 meses)
PE (cm)	$30,62 \pm 2,57b$	$32,57 \pm 2,34a$
ECC (pontos)	$2,86 \pm 0,36a$	$3,02 \pm 0,46a$
CAP (pontos)	$64,95 \pm 10,56a$	$63,81 \pm 10,6a$

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente $P < 0,05$.

Foi realizada a análise da correlação entre perímetro escrotal (PE) e idade e foi observada correlação positiva entre as duas variáveis ($r = 0,48$; Fig. 1).

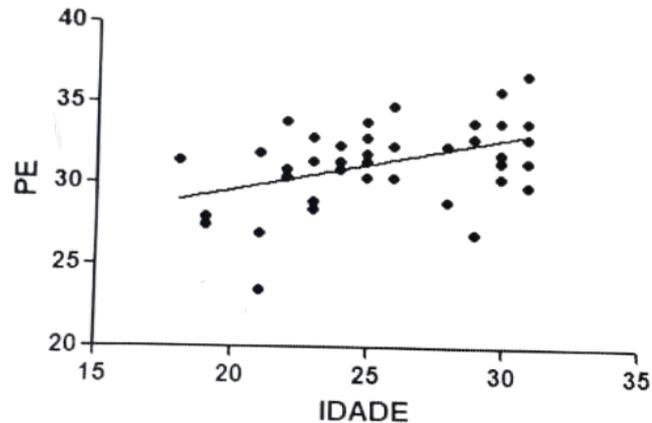


Figura 1. Correlação entre perímetro escrotal (cm) e idade (meses).

Foi realizada a avaliação do Índice de Temperatura e Umidade (ITU), temperatura ambiental média, umidade relativa média, e temperatura máxima do dia (Fig. 2). O ITU apresentou diferença significativa sendo maior no T20 quando comparado com o T0 e T65 ($P < 0,05$).

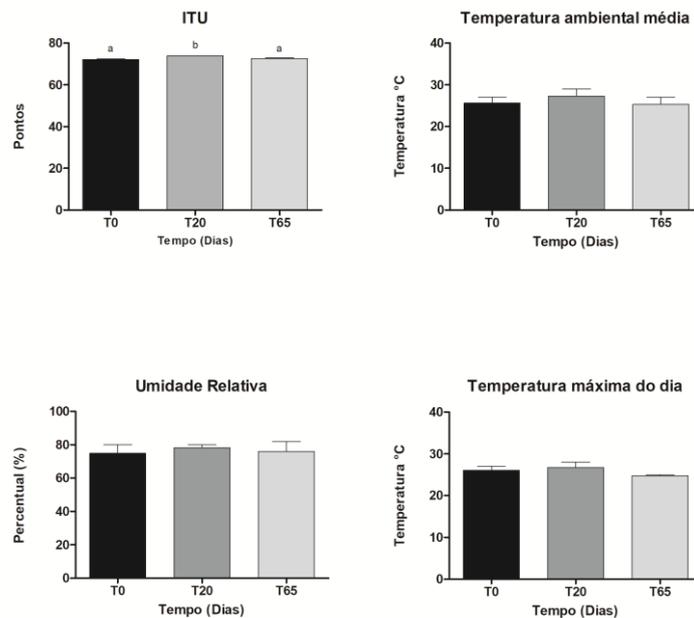


Figura 2. Caracterização ambiental. T0 (dia que os animais chegaram para a adaptação). T20 (20 dias após a adaptação dos animais). T65 (65 dias após a adaptação dos animais).

São apresentados na Tabela 2 os parâmetros seminais avaliados. Não foi observada diferença significativa entre vigor, percentual de defeitos maiores e totais ($P > 0,05$) entre os grupos A e B e entre os tempos. No entanto, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na motilidade no Grupo A versus Grupo B entre o T20 e T65 ($70,71 \pm 10,76\%$ vs $57,38 \pm 22,45\%$) e

(69,05±17,29% vs 54,29±29,08%). O percentual de defeitos menores ($P<0,05$) foi inferior no Grupo A (T20) 3,43±3,25% comparado ao B (T65) 10,19±9,73%.

Tabela 2. Parâmetros seminais do exame andrológico (média ± desvio padrão).

Parâmetros seminais	GRUPO A (18 a 25 meses)		GRUPO B (26 a 31 meses)	
	T20	T65	T20	T65
Vigor (pontos)	3,57 ± 0,60a	3,67 ± 0,73a	3,33 ± 0,66a	3,10 ± 1,18a
Motilidade (%)	70,71 ± 10,76a	69,05 ± 17,29a	57,38 ± 22,45b	54,29 ± 29,08b
Defeitos maiores (%)	16,95 ± 9,88a	19,33 ± 12,09a	15,87 ± 11,52a	13,64 ± 9,15a
Defeitos menores (%)	3,43 ± 3,25b	4,88 ± 6,92ab	6,10 ± 8,90ab	10,19 ± 9,73a
Defeitos totais (%)	20,38 ± 10,01a	24,21 ± 14,93a	21,96 ± 15,86a	23,83 ± 13,63a

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P<0,05$). T20 (coleta seminal realizada 20 dias após a adaptação dos animais). T65 (coleta seminal realizada 65 dias após a adaptação dos animais).

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para a avaliação de parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides (Tab. 3) quanto a largura/comprimento, elipsidade, fator de formato, Fourier 1 e 2, simetria lateral e simetria anteroposterior.

Tabela 3. Análise de parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides (média ± desvio padrão).

Parâmetros morfométricos	GRUPO A (18 a 25 meses)		GRUPO B (26 a 31 meses)	
	T20	T65	T20	T65
Área (μm)	10,07 ± 0,58b	10,52 ± 0,42a	9,82 ± 0,59b	10,33 ± 0,69a
Perímetro (μm)	10,33 ± 0,32b	10,61 ± 0,27a	10,27 ± 0,34b	10,54 ± 0,30ab
Largura (μm)	2,06 ± 0,06ab	2,12 ± 0,06a	2,03 ± 0,07b	2,09 ± 0,07a
Comprimento (μm)	4,00 ± 0,14ab	4,11 ± 0,14a	3,97 ± 0,13b	4,07 ± 0,14ab
Largura/Comprimento	0,52 ± 0,02a	0,52 ± 0,02a	0,51 ± 0,01a	0,52 ± 0,02a
Elipsidade	0,32 ± 0,02a	0,32 ± 0,02a	0,32 ± 0,01a	0,32 ± 0,02a
Fator de formato	0,90 ± 0,01a	0,91 ± 0,01a	0,91 ± 0,01a	0,91 ± 0,01a
Fourier 1	787,17 ± 71,55a	822,72 ± 81,65a	791,33 ± 49,52a	812,45 ± 66,98a
Fourier 2	85,52 ± 14,75a	93,95 ± 17,13a	89,96 ± 15,33a	90,49 ± 12,84a
Fourier 3	75,45 ± 6,01a	75,96 ± 5,06a	70,01 ± 4,37b	71,96 ± 4,97ab
Simetria Lateral	0,95 ± 0,00a	0,95 ± 0,02a	0,94 ± 0,02a	0,95 ± 0,02a
Simetria Anteroposterior	0,92 ± 0,01a	0,91 ± 0,01a	0,92 ± 0,01a	0,92 ± 0,01a

^{ab} letras diferentes na mesma linha difere significativamente ($P<0,05$). T20 (coleta seminal realizada 20 dias após a adaptação dos animais). T65 (coleta seminal realizada 65 dias após a adaptação dos animais).

Por outro lado, a área da cabeça foi menor ($P<0,05$) no Grupo A (T20) 10,07±0,58 μm e no Grupo B (T20) 9,82±0,59 μm comparado ao Grupo A (T65) 10,52±0,42 μm e Grupo B (T65) 10,33±0,69 μm . O perímetro do Grupo A (T65) 10,61±0,27 μm foi maior ($P<0,05$) que o Grupo A (T20) 10,33 ± 0,32 μm e Grupo B (T20) 10,27 ± 0,34 μm . A largura do Grupo A (T65) 2,12±0,06 μm e do Grupo B (T65) 2,09 ± 0,07 μm foi maior ($P<0,05$) que o Grupo B

(T20) $2,03 \pm 0,07 \mu\text{m}$. O comprimento do Grupo A (T65) $4,11 \pm 0,14 \mu\text{m}$ foi maior ($P < 0,05$) que o Grupo B (T20) $3,97 \pm 0,13 \mu\text{m}$. E Fourier 3 do Grupo B (T20) $70,01 \pm 4,37$ foi menor ($P < 0,05$) que o Grupo A (T20) $75,45 \pm 6,01$ e (T65) $75,96 \pm 5,06$.

Discussão

A diferença encontrada no PE entre os grupos do estudo e a correlação positiva entre PE e idade reforçam relatos da literatura, nos quais conforme aumenta a idade ocorre aumento significativo do PE. O desenvolvimento testicular em touros ocorre lentamente durante o período infantil, e rapidamente durante a puberdade, até a estabilidade quando atinge a maturidade sexual (Gressler *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2011).

O ECC se baseia na observação da deposição de gordura na inserção da cauda (Mercadante *et al.*, 2006). Dessa forma, a não diferença encontrada entre os grupos para essa característica demonstra que ambos iniciaram o período experimental com as mesmas condições corporais. Da mesma maneira, a não diferença para a CAP, já que de acordo com Fonseca *et al.* (1997) os touros desse experimento se enquadram dentro da classificação de bons e se apresentam como aptos para reprodução.

Todos os ITUs calculados durante o período das águas se encaixam dentro da categoria considerada normal por apresentar pontuação menor que 74. Portanto, o ambiente se encontrava confortável termicamente (Brown-Brandl, 2018), embora com momentos de alerta para estresse térmico alcançando valores próximos a 74.

A flutuação da temperatura ambiental média encontrada durante o período experimental não é uma adversidade. Espécies que apresentam chifres e adaptadas para viver em ambientes quentes apresentam maior vascularização e área de superfície que espécies da região temperada. Isto contribui com o processo de troca de calor (Souto *et al.*, 2021).

Por outro lado, a alta umidade relativa média encontrada nesse estudo pode ser responsável por dificultar o equilíbrio térmico, visto que com umidade alta ocorre redução da perda de calor corporal para o ambiente devido a preservação da evaporação (Cattelan e Vale, 2013).

Por mais que os animais se mostrem adaptados ao ambiente, a termorregulação testicular é regulada por um processo independente da regulação da temperatura corporal. A temperatura testicular ideal é de 4 a 6°C abaixo da temperatura corporal e qualquer alteração durante a espermatogênese, por exemplo elevação da temperatura corporal ou do ambiente, como observada nesse estudo em diferentes momentos, leva a uma queda na qualidade seminal e proporciona considerável modificação na qualidade da morfologia espermática. Isto interfere

na viabilidade e na produção de espermatozoides (Queiroz *et al.*, 2015; Ronda *et al.*, 2019; Souto *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que nos momentos em que o ITU se aproxima do estresse térmico alterações no fluxo sanguíneo do testículo ocorrem devido a presença de termorreceptores no escroto, os quais são responsáveis por estimular um retorno fisiológico para dissipar calor e manter a temperatura escrotal. A perda de calor ocorre pelo plexo pampiniforme que rodeia a artéria testicular, realizando a refrigeração do sangue arterial pelo mecanismo de contracorrente (sangue arterial perde calor para o sangue venoso; Garcia, 2004). Essas alterações são relacionadas a alterações na qualidade seminal (Ribeiro *et al.*, 2020).

O estresse térmico testicular pode influenciar os parâmetros morfométricos de cabeças de espermatozoides em diferentes momentos após a insolação e induzir a descompactação da cromatina. Além disso, pode induzir danos na membrana espermática, os tornando susceptíveis a problemas morfológicos (Lucio *et al.*, 2016).

A flutuação da temperatura ambiental média, alta umidade relativa, altas temperaturas ambientais e ITU próximo ao estresse térmico sugerem a ocorrência de disfunção da termorregulação testicular durante o período experimental, a qual ocasionou as diferenças encontradas entre as duas coletas para parâmetros seminais (defeitos espermáticos menores) e morfométricos da cabeça dos espermatozoides (área, perímetro, largura, comprimento e Fourier 3), mas sem significância fisiopatológica.

Além disso, Beletti *et al.* (2005) afirmaram que alterações dos parâmetros morfométricos das cabeças dos espermatozoides estão relacionados a descompactação da cromatina, apresentando cabeças geralmente assimétricas e de menor tamanho.

Outros fatores a serem considerados são o formato testicular e a espessura da pele escrotal, os quais se alteram com o avançar da idade e apresentam ligação com a termorregulação testicular. Animais zebuínos entre 17 e 20 meses apresentam forma oval longa e com o avançar da idade uma alteração do formato testicular ocorre até que se estabiliza o formato testicular mais arredondado e com maior área de superfície. Maior área de superfície leva a maior facilidade em dissipar calor e temperaturas superficiais testiculares mais baixas. Ao contrário de forma com menor área de superfície (Ribeiro *et al.*, 2020).

O formato testicular e espessura da pele escrotal juntamente com a flutuação da temperatura ambiental média, alta umidade relativa, altas temperaturas ambientais e ITU próximo ao estresse térmico justificam as diferenças obtidas entre os grupos de idades avaliados, sugerindo que animais de diferentes idades respondem de maneiras diferentes ao ambiente

para características seminais (motilidade espermática e defeitos espermáticos menores) e morfométricas das cabeças dos espermatozoides (área, perímetro, largura, comprimento e Fourier 3).

Conclusão

Conclui-se que a raça Gir Leiteiro apresenta uma adaptabilidade singular para as referências andrológicas quanto as questões ambientais, já que por mais que diferenças significativas tenham sido encontradas entre os grupos e entre as coletas realizadas, os animais se apresentaram aptos para a reprodução.

Agradecimentos

A Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro (ABCGIL), as Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU) e a Bio Reprodução Animal pelo apoio durante a realização do trabalho.

Referências

- ABCGIL. Características do Gir Leiteiro. Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro, 2015. Disponível em: < <http://girleiteiro.org.br/?conteudo/150>>. Acessado em: 30 jul. 2021.
- ALMEIDA, J. de; AMANTE, M. C. S.; RESENDE, O. A. Importância da Avaliação Andrológica na Seleção de Touros em Fazendas de Leite. Impacto, Excelência e Produtividade das Ciências Agrárias no Brasil 4. 4. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. p. 174-185.
- ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. Rev. Bras. Repr. Anim., v. 35, p. 145-151, 2011.
- BARBOSA, E. A. Características fisiológicas e seminais de touros da raça localmente adaptadas mantidas com e sem sombreamento. 2017. 73f. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. Braz. Jour. Morpho. Sci., v.22, p.85-90, 2005.
- BIZINOTO, A. L. Efeito da ingestão de cromo sobre o ganho de peso e de alguns constituintes sanguíneos de bovinos mantidos em pastagens no cerrado, em Uberlândia, Minas Gerais. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- BROWN-BRANDL, T. M. Understanding heat stress in beef cattle. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 47, p.1-9, 2018.
- CATTELAM, J.; VALE, M. M. do. Estresse térmico em bovinos. *Rev. Port. Ciên. Vet.*, v. 588, p. 154-160, 2013.
- EDMONSON A. J.; LEAN I. J.; WAVER, L. D. et al. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journ. Dairy Sci.*, v. 72, p. 68-78, 1989.
- FONSECA, V.O.; SANTOS, N.R.; MALINSKI, P. R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. *Rev. Bras. Repr. Ani.*, v.21 p.36-39, 1997.
- GARCIA, Alexandre Rossetto. Efeitos do estresse térmico testicular e do uso de somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*). 2004. 260 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.
- GRESSLER, S. L.; BERGMANN, J. A. G.; PEREIRA, C. S. et al. Estudo das Associações Genéticas entre Perímetro Escrotal e Características Reprodutivas de Fêmeas Nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, p. 427-437, 2000.
- LUCIO, A. C.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A. et al. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. *Theriogenology.*, v. 86, p.924-933, 2016.
- MARTINS, J. A. M.; SOUZA, F. A.; FERREIRA, M. B. D. et al. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Gir selecionados para produção de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1277-1286, 2011.
- MARTINS, M. C.; GONÇALVES, L. M; NONATO, A. et al. Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. *Theriogenology.*, v.161, p. 200-209. 2021.
- MEDEIROS, L. F, D.; VIEIRA, D. H. 1ª ed. Rio de Janeiro: Bioclimatologia Animal, 1997.126p.
- MERCADANTE, M.E. Z.; RAZOOK, A. G.; SILVA, J. A. de V.; FIGUEIREDO, L. A. de. Escore de condição corporal de vacas da raça Nelore e suas relações com características de tamanho e reprodução. *Arch. Lati. Prod. Ani.*, v. 14, p. 143-147, 2006.
- NASCIMENTO, J. do; LEME, P. R.; FREITAS, M. A. R. de. et al. Zoneamento Ecológico da Pecuária Bovina do Estado de São Paulo. *B. Indústria Anim.*,v. 32, p. 185-237, 1975.

- QUEIROZ, V. L. D.; COSTA FILHO, L. C. C. da; ROSA, L. da S. et al. Sazonalidade na congelabilidade de sêmen bovino. *Arq. Ciên. Vet. Zoo.*, v.18, p.39-47, 2015.
- RIBEIRO, F. P.; FAVARA, P. da C.; GALDIOLI, V. H.G. et al. Características Biométricas e Hemodinâmica da Artéria Supra Testicular em Machos Brangus de 12 Meses de Idade. *Uniciên.*, v. 24, p. 151-157, 2020.
- RONDA, J. B.; RIBEIRO, G. L.; JACOMINI, J. O. et al. Classificação andrológica por pontos e características andrológicas na avaliação reprodutiva de touros da raça Gir candidatos ao teste de progênie. *Ciên. Ani. Bras.*, v.20, p.1-8, 2019.
- SOUTO, P. L. G.; BARBOSA, E. A.; MARTINS, E. et al. Influence of season and external morphology on thermal comfort and physiological responses in bulls from two breeds adapted to a subtropical climate. *Rev. Bras. Saú. Prod. Ani.*, v. 22, p.1-20, 2021.
- XIMENES, L. J. F.; MARTINS, G. A. Bovinocultura Leiteira: melhoramento genético-econômico. *Caderno Setorial - Etene.*, v. 52, p. 1-18, 2018.

ANEXO A



FACULDADES ASSOCIADAS DE UBERABA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FAZU / CEUA-FAZU
CIAEP: 01.0593.2019

OFÍCIO Nº 014/2021 CEUA/FAZU

Ilma. Profa.
Msc. André Rabelo Fernandes

Informo que o projeto intitulado “Influência do conforto térmico sobre a qualidade seminal e integridade do DNA espermático de touros Gir Leiteiro” foi considerado **APROVADO** pelo Comitê de Ética da FAZU, ofício número 014/2021, na reunião do dia 10 de fevereiro de 2021.

Atenciosamente,

Dra. Amanda Pifano Neto Quintal

Coordenadora CEUA/FAZU

Dra. Amanda P. N. Quintal
Coordenadora CEUA-FAZU
CIAEPE 01.0593.2019

ANEXO B

Diretrizes para preparar o manuscrito – Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 2), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número do ORCID e com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 3), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA** (Verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

Autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);

Dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);

Mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);

Mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994.
Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>.
Acessado em: 5 dez. 1994.