



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL



OCTÁVIO FABIÁN BAO TARRAGÓ

***Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as
características reprodutivas de touros da raça Nelore***

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

OCTÁVIO FABIÁN BAO TARRAGÓ

*Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as
características reprodutivas de touros da raça Nelore*

São Paulo
2009

OCTÁVIO FABIÁN BAO TARRAGÓ

Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2009

ERRATA

Página
Ficha
catalográfica

Parágrafo
3

Linha
1

Onde se lê
91 f

Leia-se
92 f

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2125
FMVZ

Tarragó, Octávio Fabián Bao

Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore / Octávio Fabián Bao Tarragó. – São Paulo : Octávio Fabián Bao Tarragó, 2009.
91 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Bovinos. 2. Touros. 3. Sêmen. 4. Ambiência. 5. Qualidade seminal.
6. Sombreado. I. Título.



PARECER

Interessado: Octavio Fabián Bao Tarragó

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em reunião do dia 01/10/08, após analisar o projeto protocolado sob o número 1449/2008, intitulado: "Efeitos do sombreamento sobre as características reprodutivas do sêmen de touros da raça Nelore", no qual foram utilizados 10 (dez) touros, sob responsabilidade do Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TARRAGÓ, Octávio Fabián Bao.

Título: Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATORIAS

Dedico esta Dissertação,

A meu filho Esteban,

A meus Pais, Osvaldo e Stella,

A meus Irmãos, Oscar, Cesar e Diego.

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso Pai... Por me dar saúde, tantas alegrias, amigos, por cada um dos dias que vivi, por esse amor sem tamanho, que me faz -embora esqueci muitas vezes- o homem mais feliz...

A meus pais Osvaldo e Stella por ter me apoiado incondicionalmente sempre, sempre em cada decisão da minha vida... Pelo amor e carinho, pela exigência que me formou como pessoa, pelos cuidados durante 28 anos! A vocês minha gratidão de por vida...

A meus irmãos, Oscar, Cesar y Diego, por estarem sempre atentos as minhas necessidades aqui, um poquito longe de casa, ainda por me ajudarem a arrumar sempre uma ajuda econômica a mais quando o aperto chegava....e o mais importante, por todo o amor que senti de vocês, mesmo longe...

Ao meu orientador, amigo, por muitas vezes conselheiro e pai aqui no Brasil...Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, por primeiro, ter mi aceitado, pela incansável luta pela minha matricula, logo depois que cheguei ainda o Senhor soube entender as necessidades de uma pessoa “longe de casa” e por compreender isso com grande coração, ter a paciência de me formar no acadêmico, moral e formação humana, pela amizade e compreensão da minha situação de aluno, estrangeiro e pai jovem...pelos ensinamentos de futebol e as regras dela, claro...pela exigência que me deu um censo criterioso no trabalho...e ainda algo mais importante, por me dar a oportunidade de cumprir com meu mais anelado sonho como profissional, realizar um mestrado na melhor escola de veterinária da America do Sul, esse momento de assinar o “aceite” como orientador, mudou o rumo da minha vida e define ela para sempre, não só pra mim, como assim também para minha família no futuro, que espero Deus me gratifique com essa benção, todos nós agradecemos...espero ainda poder cooperar com a área acadêmica no meu país, o querido Paraguai, sua contribuição de educador vai atravessar as fronteiras e permanecer no tempo...MUITO OBRIGADO!!!

Ao Prof. Ed Hoffman Madureira pelos ensinamentos do dia a dia e nas aulas...

A Prof. Annelise de Souza Traldi, pela convivência e pelos conhecimentos adquiridos na área de reprodução de pequenos ruminantes...

Ao Departamento de Reprodução Animal, pela oportunidade de fazer parte de esta grande família...

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães , Prof. Dr. Jose Antonio Visintin, Pofra. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Profa. Dra. Camila Infantsi Vanucchi, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, Profa. Dra. Eneiva Carla carvalho Celeghini e ao Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira...muito Obrigadissimo!!

A Profa. Dra. Maria Claudia Sucupira, na verdade não estaria aqui sem sua ajuda ainda antes nem de ter feito a matrícula! Minha eterna gratidão bem justo na hora que iria desistir da pós-graduação, seus conselhos foram determinantes, agradeço a Deus ter posto a Senhora no meu caminho bem quando mais precisei e como madrinha do meu amado filho Esteban...

A Universidade de São Paulo á Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, por formar parte das escolhas que acolhem alunos de convênio de pós-graduação e contribuem com a formação e construção de países em via de desenvolvimento...

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) junto ao Ministério das Relações Exteriores do Governo da Republica Federal do Brasil, que permite e da a possibilidade a inúmeras pessoas de vários países de se formar nas melhores escolhas do Brasil, a alunos estrangeiros possibilitando o desenvolvimento dos países em via de desenvolvimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos...

Ao Campus da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA) por ser minha casa, durante estes mais de dois anos...

A família Rodrigues, a Elisabeth, Manuel, Mari, negrita churra! Pelo enorme carinho de vocês, lembro de cada um dos gestos de amabilidade, por mi acolher na sua família como um a mais, e a mi nega, por me escolher...por me aceitar como sou e agüentar

A família Weigel, pela hospitalidade no começo dos meus estudos no Brasil, toda minha eterna gratidão a vocês!

A Esteban Almada, quem me guiou por tanto tempo, pela paciência em tentar me dar educação cristã, por tanto carinho e preocupação e claro também por ter me exigido comportamento humano com meus próximos...em fim tanta formação, espero tenha aprendido algo...!

A Fernando Pardo, talvez meu primeiro amigo aqui em Pirassunga, por ter se preocupado em mostrar os lugares que iria precisar, mercado, farmácia, banco, etc...e dar uma carona até lá claro...

Felipão (Fedosia) colega e amigo da casa dos pós-graduandos do VRA e companhia em muitos fins de semana em pira...

Rodrigão (Zê), também amigo, colega...conselheiro, caroneiro, pela incansável paciência de me levar pra cidade para cada umas dos vários tipos de necessidades, banco, correio, mercado e banco, correio e mercado de novo, por me agüentar também mais do que nada...sem tua ajuda ia ser bem difícil mi virar aqui nestes mais de dois anos...

Meu chera' a Paulito Fantinato, este é um amigão, me emprestaste o carro assim que quis, pela ajuda nos sábados e domingos das 06:00 AM até as 00:00 horas no período do experimento, mais importante que isso, pela amizade verdadeira, pelos tererés e tantas horas de companhia e conversação...

Ao Andre Simprão, pela ajuda no desenvolvimento do projeto experimental, nas análises estatística do trabalho e as caronas e ser colega de esporte, por essas piadas "sem sentido nenhum" e também claro pela amizade por sobre tudo...

A Simone, pela ajuda tão justo na hora...na formatação da dissertação e a paciência para explicar!

Fabiane Zaffalon (Gligigli..) pela ajuda ao experimento, amizade, carona a cidade, pelas brincadeiras e outros "comentários"...simplesmente pela companhia de colega amiga, muuuito obrigado Fabiane, desejo pra você e o Paulão muita felicidades....

A Juliana Nascimento, colega e amiga por todas as brincadeiras que faz nosso dia mais bonito...

A Claudinha Raphael, pela amizade e conselhos durante o final da tua dissertação...Obrigado!

Ao venezuelano da Colômbia, Andrés Mejias: PARCE, desejo para você um futuro lindo, cheio de realizações na Colômbia querida! Agradeço a você pela amizade, me escutar até altas horas da madrugada, todos meus problemas e ainda querer resolver os... Pelos conselhos de amigo, companhia, fazer mercado pra mim, sem pedir... Pela preocupação dos meus problemas como se fossem teus, em fim venezuelano, por ser amigo de verdade e com todas as letras...

Á cubana Patricia Fernandes, professora de inglês e mais que nada amiga, obrigado mesmo, por ter essa coragem de encarar um aluno...como eu, sem essa ajuda não teria possibilidade de realizar nenhuma das disciplinas da pós-graduação...

Chico (mercedita), super amigo, agradeço tua amizade, uma das melhores pessoas que conheci fora do ambiente acadêmico, você fez que minha experiência aqui fosse muito mais agradável, amigos assim fazem o dia a dia muito mais feliz...

Colegas e amigos do futebol, Zé mineiro, Fernando Amaral, Tenente, Felipe Foca, Vanius o fenômeno, Andre coluna, Diego Cucco, o Costenho, Peixe, Samuel gaucho, Valter...

A Diego (boliviano) pela amizade mais que nada...êxitos no doutorado!

Aos motoristas da FMVZ, o Reinaldo e Humberto, pelo leve e traz, tantas vezes a São Paulo para as mais diversas atividades...

A Harumi Doi Shiraishi, pela presteza e amabilidade de sempre para resolver questões relacionadas à pós-graduação...

Ao Secretario do CBRA em Pirassununga, Clayton D. Costa, pela amizade e prontidão para pedir carro oficial e pelos jogos de futebol convidados, brigado Clayton...

As secretarias do Departamento de São Paulo, Thais Soto Longarço e Maria Alice de Oliveira por todas as ajudas que me deram, itinerário de ônibus em São Paulo, etc, etc...

Aos funcionários do CBRA, Marcio de Carli, João Carlos Pinto (“só alegria rapaz” e José Maria Bernardi, pela amizade de vocês, por todas as mãos que me deram ate em dias de sábados e domingos para a realização deste trabalho, mas principalmente pela grande amizade de todos vocês...

A Dona Edna, pelos cafés da cada manha e tarde... Também pelos pães, frutas, “conselhos de limpeza”, por me emprestar o carro pra ir ao almoço, etc, etc...e mais que nada por ser minha amiga...

A todos meus amigos colegas da pós-graduação em São Paulo, Gabriel, Zé, Paulão, Fabiane, Mariana, Camila, Marcilio, a Lindsay amiga e colega de pira e Sampa, teu motorista particular agradece as caronas e craro a amizade por sobretudo...

Aos tantos estagiários que com suas ajudas e companhias me ajudaram à realização deste experimento: Paulo Gusmão (Bússola Fernandes) mais do que nada um grande amigo! A Ana Paula (Gutirerres), Carol Camargo, a amiga das caronas e longas conversas de estrada, a Giselle, Thais, Joice, Eduardo e Mirna...muito obrigado por todas as ajudas...

Mais uma vez a TODOS meus professores, amigos e amigas, obrigados pela amizade e convivência neste maravilhoso país...

RESUMO

TARRAGÓ, O. F. B. **Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore.** [Effects of the overshadow availability at pasture on the reproductive characteristics in Nelore Bulls]. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Sabe-se que a principal causa da diminuição do desempenho reprodutivo de um touro é o estresse térmico levando conseqüentemente à degeneração testicular. Esta alteração patológica poderá ocorrer mesmo nos animais zebuínos. O objetivo deste experimento foi verificar os efeitos da disponibilidade de sombras na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore. Foram utilizados 10 touros com idades de 26 ± 2 meses. Previamente ao início do experimento, os animais foram mantidos durante 30 dias em regime de colheita de sêmen a cada 15 dias para avaliação das características físicas e morfológicas. Então, logo após, os animais foram classificados segundo um índice que representou a soma dos valores das características espermáticas e distribuídos uniformemente em dois grupos ou tratamentos experimentais: Com Sombra (CS) e Sem Sombra (SS). No grupo CS, cinco (5) animais foram colocados em um piquete (2 hectares) com área de sombra, consistente em *Sombrites* de polietileno com 90% de retenção da luz solar, com 10 m² de sombra por animal. No grupo SS, os outros cinco (5) animais permaneceram em outro piquete (2 hectares) porém, não tiveram acesso à área de sombra. Foram realizadas colheitas de sêmen de cada animal a cada 15 dias, durante quatro (4) meses, bem como, mensurações do perímetro escrotal e da consistência testicular. Logo após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração, parâmetros de motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA – *Computer Assisted Semen Analysis*), alterações morfológicas por contraste de interferência diferencial (DIC), integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e função mitocondrial por microscopia de epifluorescência. Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0.05$) em nenhuma das características reprodutivas estudadas quando touros da raça Nelore foram submetidos aos ambientes com ou sem sombra.

Palavras-chave: Touros. Sêmen. Ambiência. Qualidade seminal. Sombreado.

ABSTRACT

TARRAGÓ, O. F. B. **Effects of the overshadow availability at pasture on the reproductive characteristics in Nelore Bulls.** [Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore]. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

It is known that heat stress is the main cause that affects bulls reproductive performance, consequently led to testicular degeneration. This pathologic alteration can also occur in *Bos Indicus* cattle. The objective of this experiment was verify the shadow availability effect at pasture on reproductive characteristics in Nelore, a *Bos Indicus* bull. For this work, 10 bulls with ages of 20 ± 10 months were used. A month before the experiment started, semen samples were collected each 15 days for physical and morphological sperm evaluation. After this, animals were classified with a score according to the sperm characteristics values sum and then distributed in two groups: with Overshadow (CS) and without Overshadow (SS). In the group CS, 5 animals were kept in a picket (2 ha), with a 10 m^2 shaded area per animal, consisted in a polyethylene filter with 90% solar light retention. In the group SS, the others 5 animals were placed in another picket (2 ha) with no access to shaded area. Semen collection, scrotal perimeter and testicular consistence measures occurred every 15 days, for a 4 months period. After collection, semen samples were submitted to following analysis: volume, sperm concentration, sperm motility by computer system (CASA - Computer Assisted Semen Analysis), morphological defects using differential interference contrast (DIC), plasmatic acrossosomal membrane integrity and mitochondrial function by epifluorescence microscopy. Data obtained from experimental proceedings were analyzed by Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc., 2004). It wasn't find any statistical differences ($P > 0,05$) in reproductive characteristics, when Nelore bulls were kept under environmental conditions with or without overshadow.

Keywords: Bulls. Sperm. Environment. Seminal quality. Overshadow

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelo matemático de análise de variância em delineamento em blocos adicionados do complemento de delineamento medidas repetidas no tempo determinado para o experimento – Pirassununga, 2009	53
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cronologia do Experimento.....	41
Figura 2 - Fórmula referente ao índice reprodutivo (nota do animal) a ser calculado para separação dos grupos experimentais (GARCIA, 2004).....	42
Figura 3 - Animais do grupo com sombreado artificial. a) Sombrite com.....	43
Figura 4 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais	46
Figura 5 - Fotomicrografia de epifluorescência de células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (aumento de 1000x): A. células espermáticas com alto potencial mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal; B. célula espermática com baixo potencial mitocondrial (mitocôndrias verdes), com membrana plasmática rompida (núcleo vermelho) e com membrana acrossomal rompida (verde); C. célula espermática com alto potencial mitocondrial, com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal rompida (mitocôndrias vermelho-laranja); D. célula espermática com alto potencial mitocondrial, com membrana plasmática rompida e membrana acrossomal íntegra.	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Temperaturas máximas, mínimas e médias durante o período de 12/01/2008 a 30/04/2008 – Pirassununga – SP, 2009	55
Gráfico 2 - Valores das médias da umidade relativa do ar durante o período de 12/01/2008 a 30/04/2008 – Pirassununga – SP, 2009	56
Gráfico 3 - Valores das médias (\pm erros padrão) do perímetro escrotal (CE) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes Com Sombra (CS) ou Sem Sombra (SS) - Pirassununga - 2009	57
Gráfico 4 - Valores das médias (\pm erros padrão) da consistência testicular de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	58
Gráfico 5 - Valores das médias (\pm erros padrão) do total de defeitos maiores dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009.....	59
Gráfico 6 - Valores das médias (\pm erros padrão) do total de defeitos menores dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009.....	60
Gráfico 7 - Valores das médias (\pm erros padrão) do total de defeitos espermáticos de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	61
Gráfico 8 - Valores das médias (\pm erros padrão) da motilidade total dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem	62
Gráfico9 - Valores das médias (\pm erros padrão) da motilidade progressiva dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	63
Gráfico 10 - Valores das médias (\pm erros padrão) da velocidade de trajeto (VAP) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	64
Gráfico 11 - Valores das médias (\pm erros padrão) da velocidade progressiva (VSL) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	65
Gráfico 12 - Valores das médias (\pm erros padrão) da velocidade curvilínea (VCL) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos	

ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	66
Gráfico 13 Valores das médias (\pm erros padrão) da amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009.....	67
Gráfico 14 - Valores das médias (\pm erros padrão) da frequência de batimentos flagelares (BCF) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009.....	68
Gráfico 15 - Valores das médias (\pm erros padrão) da retilinearidade (STR) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009.....	69
Gráfico 16 - Valores das médias (\pm erros padrão) da linearidade (LIN) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009.....	70
Gráfico 17 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozóides com membrana plasmática íntegra (PMI) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009.....	72
Gráfico 18 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozóides com acrossomo íntegro (AI) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	73
Gráfico 19 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozóides com alto potencial mitocondrial (PM) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	74
Gráfico 20 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozóides com alto potencial mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal (PIAIC), de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009	75
Gráfico 21 - Valores das médias das variáveis estudadas nos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	microgramas
μL	microlitros
$\mu\text{m/s}$	micrômetros por segundo
ABIEC	associação brasileira das indústrias exportadoras de carne
ALH	amplitude lateral da cabeça
ANOVA	análise de variância
ARN	ácido ribonucléico
ATP	trifosfato de adenosina
BCF	frequência de batimentos
CASA	análises computadorizado da motilidade
CS	com sombra
DIC	microscopia de contraste de interferência diferencial
DNA	ácido desoxirribonucléico
FITC	isotiocionato de fluoresceína
Hz	Hertz
IM	inverso da motilidade
JC-1	iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolicarbocyanina
K^+	íon potássio
Km^2	quilômetros quadrados
LIN	linearidade
m^2	metros quadrados
mL	mililitros

Na ⁺	íon sódio
nm	nanômetro
PI	iodeto de propídeo
PIAIC	membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com função mitocondrial
PIAIS	membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem função mitocondrial
PIALC	membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com função mitocondrial
PIALS	membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem função mitocondrial
PLAIC	membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e com função mitocondrial
PLAIS	membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem função mitocondrial
PLALC	membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com função mitocondrial
PLALS	membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem função mitocondrial
PO	puro de origem
ROS	espécies reativas de oxigênio
SAS	sistema de análises estatística
SS	sem sombra
STR	retilinearidade
TALP	meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato
TDMA	total de defeitos maiores
TDME	total de defeitos menores
VAP	velocidade do trajeto
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

±	mais o menos
>	maior que
%	porcentagem
°C	graus Celsius
α	alfa
x	vezes
10 ⁶	milhões
:	para (1:100)
=	igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	27
3 LITERATURA	29
3.1 O TOURO NA CADEIA PRODUTIVA DA CARNE	29
3.2 AMBIÊNCIA E BEM-ESTAR ANIMAL	29
3.3 CONFORTO TÉRMICO DE BOVINOS	30
3.4 ESTRESSE TÉRMICO	31
3.5 DEGENERAÇÃO TESTICULAR E MECANISMOS DE TERMORREGULAÇÃO EM BOVINOS	32
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL, INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL UTILIZANDO SONDAS FLUORESCENTES POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA	35
4 MATERIAL E MÉTODO	40
4.1 ANIMAIS, MANEJO EXPERIMENTAL E ZOOTÉCNICO	40
4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS AOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS	40
4.3 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTAL E DA UMIDADE RELATIVA DO AR	44
4.4 MENSURAÇÃO DO PERÍMETRO ESCROTAL E DA CONSISTÊNCIA TESTICULAR	44
4.5 COLHEITA DO SÊMEN	45
4.6 AVALIAÇÕES DO SÊMEN	45
4.6.1 Determinação do Volume Seminal	45
4.6.2 Concentração Espermática	47
4.6.3 Avaliação Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis)	47
4.6.3.1 Trajeto da Célula	47
4.6.3.2 Velocidade Progressiva (VSL)	48
4.6.3.3 Velocidade Curvilinear (VCL)	48
4.6.3.4 Velocidade de Trajeto (VAP)	48
4.6.3.5 Retilinearidade (STR)	49
4.6.3.6 Linearidade (LIN)	49
4.6.3.7 Motilidade Progressiva	49
4.6.3.8 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH)	50
4.6.3.9 Freqüência de Batimentos (BCF)	50

4.6.4 Características Morfológicas dos Espermatozóides	50
4.6.5 Avaliação do Potencial Mitocondrial e Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal por Microscopia de Epifluorescência (celeghini et al., 2007).....	51
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	55
5.1 DADOS CLIMÁTICOS.....	55
5.2 PERÍMETRO ESCROTAL.....	57
5.3 CONSISTÊNCIA TESTICULAR.....	58
5.4 TOTAL DE DEFEITOS MAIORES	59
5.5 TOTAL DE DEFEITOS MENORES	60
5.6 TOTAL DE DEFEITOS ESPERMÁTICOS.....	61
5.7 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS - CASA).....	62
5.7.1 Motilidade Total	62
5.7.2 Motilidade Progressiva	63
5.7.3 Velocidade do Trajeto (VAP)	64
5.7.4 Velocidade Progressiva (VSL).....	65
5.7.5 Velocidade Curvilinear (VCL)	66
5.7.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH).....	67
5.7.7 Freqüência de Batimentos (BCF).....	68
5.7.8 Retilinearidade (STR)	69
5.7.9 Linearidade (LIN)	70
5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL E INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA	71
5.8.1 Integridade da Membrana Plasmática Espermática.....	72
5.8.2 Integridade da Membrana Acrossomal Espermática	73
5.8.3 Potencial Mitocondrial Espermático	74
5.8.4 Células com Alto Potencial Mitocondrial, Integridade da Membrana Plasmática e Acrossomal	75
5.8.5 Resumo das Variáveis Estudadas.....	76
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIA.....	87

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A produção da pecuária bovina de corte é de grande importância econômica para o Brasil. No ano 2008 o Brasil possuía um rebanho bovino de 190,2 milhões de animais e uma produção de 9,01 milhões de toneladas em equivalente carcaça de carne, a exportação gerou 5,32 milhões de US\$ para a economia nacional. No ano 2008 totalizaram 1,38 milhões de toneladas líquidas de carne exportada (ABIEC, 2009). O Brasil com mais de 8 milhões de km² é o maior país da América do Sul e o quinto no mundo. Esta extensão de terra oferece um potencial de produtividade, ainda muito maior otimizando os sistemas de produção.

O touro é responsável por mais de 90% das prenhez em um rebanho e a falha reprodutiva dele tem um impacto econômico muito maior a da falha de uma fêmea bovina. A fertilidade insatisfatória do touro é umas das principais causas de impacto negativo e significativo nos índices de prenhez de fêmeas em uma fazenda, embora possam existir outras causas como, sanitárias, nutricionais, de manejo, etc.

É sabido que os touros taurinos não possuem todas as características de adaptação aos trópicos como os das raças zebuínas. Sendo, estes, afetados pela alta temperatura e umidade sofrem estresse térmico e a consequência, entre outras, é a degeneração testicular. Em contrapartida os animais zebuínos, espécie adaptada aos trópicos, sofrem menos as agressões das altas temperaturas e umidade das regiões tropicais e subtropicais, porém não é conhecido com profundidade se os touros zebuínos não são afetados nas características reprodutivas e do sêmen ainda mais nas situações de criação atuais, onde a escassez de sombras naturais nas criações extensivas é uma situação comum em fazendas de todo o país. Adquirem mais importância ainda os touros zebuínos por representarem mais de 80% dos machos bovinos que tem como responsabilidade emprenhar as vacas e novilhas a campo, sendo a raça Nelore a predominante.

Entre os diversos fatores que provocam diminuição no desempenho de reprodutores, a degeneração testicular é a afecção mais comum observada. Sabe-se que o estresse térmico é a causa mais comum da degeneração testicular em touros (BARTH, 1993), sendo esta, o motivo mais frequente de baixa fertilidade em machos bovinos no Brasil (VALE FILHO et al., 1979). Em estudo sobre a origem de baixa fertilidade e infertilidade em touros, Vale Filho et al. (1979) detectaram que 40,3% dos animais que serviam em rebanhos de criação extensiva apresentavam baixa fertilidade a campo, tendo como causa a degeneração testicular, mesmo em raças zebuínas.

Os bovinos mantidos em pastagens de regiões tropicais buscam a sombra regularmente como recurso de conforto térmico nos períodos mais quentes do dia. Ambientes com altas temperaturas tornam-se estressantes para estes animais principalmente devido à radiação solar e à umidade relativa do ar. Em ambiente aberto, a pasto a radiação solar representa a maior fonte de calor adquirida pelos animais através do ambiente. Uma alternativa para evitar o estresse térmico causado pela radiação é o uso do sombreado, que diminui a incidência de radiação sobre o animal, beneficiando o conforto térmico e favorecendo a homeotermia (GLASER, 2008). Partindo da premissa de fornecer ao animal condições ideais, a disponibilidade de sombra na pastagem se destaca como uma alternativa, não apenas ecologicamente correta, mas também, economicamente viável.

Esta pesquisa justifica-se pelo fato de que a maioria dos trabalhos realizados para avaliar as características reprodutivas de machos da raça Nelore, e sua comparação com outras raças, foram realizados com técnicas subjetivas. Justifica-se também pelo fato de que criações de bovinos de corte não apresentam, em muitos casos, uma área com disponibilidade de sombra que possibilite o bem estar animal.

O presente trabalho visa esclarecer o efeito da disponibilidade ou não de sombra na pastagem sobre o perímetro escrotal, a consistência testicular, as características seminais, avaliadas por análises computadorizadas (CASA), análises da função mitocondrial, da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da morfologia em touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*).

2 OBJETIVOS

Considerando a importância do assunto em questão e as poucas informações disponíveis na literatura, o **objetivo geral** desta pesquisa foi verificar se a manutenção de touros da raça Nelore em áreas de pastagem com disponibilidade ou não de sombra trará benefícios significativos quanto às características reprodutivas e qualidade do sêmen. Os **objetivos específicos** foram:

- Avaliar possíveis alterações no perímetro escrotal e consistência testicular de touros da raça Nelore, quando mantidos em pastagens com disponibilidade ou não de sombra;
- Avaliar possíveis alterações da motilidade (CASA) e características morfológicas nos espermatozoides de touros da raça Nelore, quando mantidos em pastagens com disponibilidade ou não de sombra e;
- Avaliar através do uso da técnica microscopia de epifluorescência, as possíveis alterações na integridade de membrana plasmática, do acrossomo e função mitocondrial nos espermatozoides de touros da raça Nelore, quando mantidos em pastagens com disponibilidade ou não de sombra.

3 LITERATURA

3.1 O TOURO NA CADEIA PRODUTIVA DA CARNE

O Brasil possui 69 milhões de vacas e novilhas em idade reprodutiva (ANUALPEC, 2008), delas apenas um 7% é inseminada (ASBIA, 2008) assim mais de 90% das prenhezés é responsabilidade dos touros principalmente a campo e regime de monta natural. Os efeitos deletérios das condições ambientais, em regiões tropicais sobre o aspecto reprodutivo é relevante no que diz respeito aos touros. Quando uma vaca falha ao reproduzir-se por qualquer razão, perde-se um bezerro, porém quando um touro falha há uma perda potencial de 25 a 50 bezerras para cada 100 vacas (CARRILLO, 1998). Vale e Filho et al., (1979) observaram que dentro das causas de diminuição da fertilidade em touros, a principal é a degeneração testicular, que tem por sua vez, o estresse térmico a origem da ocorrência.

3.2 AMBIÊNCIA E BEM-ESTAR ANIMAL

A temperatura interna da maioria dos mamíferos situa-se na faixa de 36° a 40°C, sendo, conseqüentemente, mais alta que a temperatura do ar encontrado em grande parte dos ambientes terrestres. Assim, não é de se surpreender que a evolução dos mecanismos de termorregulação desses animais tenha tomado o rumo do controle acurado da transferência de calor do corpo para o ambiente. Desta forma, a adaptação a um ambiente frio exige apenas uma melhora quantitativa daqueles mecanismos que restringem a perda de calor e aumentam a produção de calor endógeno. Por outro lado, é muito mais difícil a termorregulação eficaz sob condições de calor intenso, normalmente onde a água é escassa. Quando a temperatura ambiente excede a da pele, o gradiente térmico normal inverte-se e o calor flui do ambiente para o corpo (HARDY, 1981). Também o mesmo autor destaca a importância de separar os desafios fisiológicos associados a um ambiente quente e seco dos encontrados em um quente e úmido. Em condições quentes e secas o baixo teor de umidade atmosférico facilita a

evaporação, tornando muito eficaz o resfriamento evaporativo. No entanto, uma vez que a água é escassa nessa situação, a extensão do resfriamento por evaporação é usualmente limitada pela disponibilidade de água.

A busca de sombra e seus efeitos sobre a distribuição dos animais nas pastagens, também foram discutidos por Paranhos da Costa e Cromberg (1997), destacando que em ambientes quentes, com alta incidência de radiação solar, devemos proporcionar sombra para os animais, reduzindo o aquecimento corporal e facilitando a termorregulação.

Para que o bem estar possa ser comparado em situações diversas ou avaliado em uma situação específica, deve ser medido de forma objetiva. Os animais têm vários sistemas funcionais, os quais controlam a temperatura corporal, o estado nutricional, as interações sociais e outros. Em conjunto, estes sistemas funcionais permitem que o indivíduo controle suas interações com o seu meio ambiente e, desta forma, mantenha cada aspecto de seu estado dentro de uma variação tolerável. Broom e Molento (2004) em revisão sobre o conceito bem estar, concluíram que se devem refinar as formas de medir o grau de bem estar dos animais, para que estas avaliações possam ser utilizadas no sentido de se aprimorar as relações entre seres humanos e animais, até que se atinja um nível considerado apropriado por uma sociedade informada e justa.

Atualmente, as exigências do mercado internacional com respeito ao bem estar dos animais de produção são crescentes e tendem a aumentar cada vez mais, exigindo que os técnicos implementem sistemas de manejo que respeitem as necessidades físicas dos animais. Dentro desse novo contexto, se faz necessário que os estabelecimentos adotem certas mudanças administrativas relativamente simples, porém que tragam implícitos um maior conhecimento e respeito pela biologia dos animais (COSTA; SILVA; RUSSI, 2005).

3.3 CONFORTO TÉRMICO DE BOVINOS

Os bovinos são animais homeotermos, ou seja, apresentam funções fisiológicas destinadas a manter a temperatura corporal constante. Dentro de uma determinada faixa de temperatura ambiente, denominada zona de conforto térmico ou de termoneutralidade, a manutenção da temperatura corporal ocorre com a mínima mobilização dos mecanismos

termorreguladores. Nesta situação, o animal não sofre estresse por calor ou frio e ocorre mínimo desgaste, além de melhores condições de saúde e de produtividade (TITTO, 1998).

No mundo atual, as preocupações sobre conforto ambiental e bem estar animal, estão cada vez maiores, redirecionando a retomada de novos valores, com propostas de condições mais naturais para os animais dentro do sistema de produção, visando, não apenas um produto final impecável, mas, sim todo o processo de produção. Destaca-se a importância do uso de artificios naturais que possam contribuir para estabelecer o bem estar e o conforto dos animais, sejam eles taurinos ou zebuínos (PARANHOS DA COSTA, 2000).

3.4 ESTRESSE TÉRMICO

Um animal está em estado de estresse quando necessita alterar de maneira extrema sua fisiologia ou comportamento para adaptar-se a aspectos adversos do seu ambiente e manejo. Essa adaptação envolve uma série de respostas neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais que funcionam para manter o equilíbrio de suas funções (BARNETT; HEMSWOTH, 1990). A termorregulação refere-se especificamente à capacidade do animal em manter a temperatura corporal estável. A habilidade de regular a temperatura interna é uma adaptação evolutiva que permite aos animais homeotermos minimizar problemas provenientes da variação da temperatura ambiente (SILANIKOVE, 2000). Quando a temperatura ambiente alcança as chamadas temperaturas críticas inferiores ou superiores e quando se faz necessário o uso de mecanismos físicos e químicos de termorregulação, dizemos que o animal está passando por estresse por calor, mais conhecido como estresse térmico (SILVA, 2000).

O aumento excessivo da temperatura corporal devido às condições ambientais adversas, como no caso de climas tropicais e subtropicais, ocasiona um aumento de reações metabólicas que, por consequência, libera mais calor nos tecidos, elevando a temperatura interna. O estresse térmico faz com que o centro do resfriamento do hipotálamo estimule o centro medial da saciedade, que inibe o centro lateral de apetite, resultando na diminuição da ingestão alimentar e consequentemente, redução da produção e reprodução (ALBRIGHT; ALLISTON, 1972).

Os touros que são submetidos a estresse térmico apresentam alterações morfológicas, bem como de funcionalidade bioquímica. Baseados na comprovação de que o sêmen de touros férteis tem maior afinidade de ligação aos glicosaminoglicanos, Ax, Gilbert e Shook (1987) avaliaram ao longo do ano a ligação da heparina aos espermatozóides dos touros. Nos períodos críticos e de calor intenso (verão) as temperaturas ambientais elevadas determinaram o estresse térmico dos animais e conseqüente elevação da porcentagem de espermatozóides anormais, atingindo um máximo de 67%, computadas as anomalias primárias e secundárias. À medida que as anormalidades espermáticas aumentaram durante o estresse o número de sítios de ligação de heparina aos espermatozóides diminuiu, neste sentido as ligações espermatozóide-heparina foi significativamente reduzida bem como a motilidade seminal também decresceu significativamente. As alterações de afinidade bioquímica dos espermatozóides aos glicosaminoglicanos determinadas pelo estresse térmico podem explicar parcialmente a baixa qualidade do sêmen de touros submetidos a estresse térmico testicular, ou de animais que são inseridos em um meio ambiente ao qual ainda não se encontram completamente adaptados.

O calor é o maior limitante da produtividade dos animais em zonas tropicais e áridas, segundo Silanikove (2000). O estresse por calor é um fator que causa perdas na produção de bovídeos nos trópicos, devido às mudanças drásticas que ocorrem nas funções biológicas do animal (ABLAS, 2002). Alterações nas condições ambientais podem causar uma redução significativa dos processos de crescimento e reprodução animal.

3.5 DEGENERAÇÃO TESTICULAR E MECANISMOS DE TERMORREGULAÇÃO EM BOVINOS

Para produção de espermatozóides férteis, a temperatura testicular dos touros deve ser 2 a 5°C abaixo da temperatura corporal. Submetidos a temperatura ambiente elevada podem apresentar aumento da temperatura corporal e conseqüentemente da temperatura testicular, afetando assim a qualidade do sêmen. Vogler et al. (1993) e Kastelic et al. (1996) verificaram que uma moderada elevação da temperatura testicular reduz a produção espermática, motilidade progressiva e número de espermatozóides vivos, além de aumentar a incidência de anormalidades em touros submetidos a insulação escrotal.

Horn (1999) constata que a qualidade do sêmen de reprodutores bovinos está intimamente correlacionada com alterações ambientais de diferentes origens. O mecanismo pelo qual a temperatura ambiente afeta a função testicular ainda é desconhecido (OHASHI et al., 1988). Para Waites e Setchell (1964) isto parece ser causado pela hipóxia que acomete o testículo quando o mesmo é exposto a altas temperaturas. Estudos de Nichi (2006) demonstram uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), maior peroxidação lipídica correlacionada a aumentos de anormalidades espermáticas em touros da raça Simental, porém estas atividades foram baixas para o grupo de touros Nelore.

Nos bovinos, a temperatura interna corporal pode variar normalmente entre 36,7°C a 39,1°C com média de 38,3°C. Para os mamíferos que possuem testículos alojados em escrotos pendulares, inclusive touros, a espermatogênese normal é dependente da manutenção da temperatura testicular entre 2 e 6°C mais baixa que a temperatura corpórea. Sabe-se que existe um gradiente de temperatura no escroto e nos testículos, que aumenta quanto mais distante estiver à estrutura relativamente à cavidade abdominal. A temperatura média da superfície escrotal de touros é de 30,4°C (pólo dorsal), 29,8°C (região média) e 28,8°C (pólo ventral) (KASTELIC, 1996).

É bem conhecido que um aumento da temperatura testicular diminui a qualidade do sêmen produzido (WAITES, 1970). Esse efeito negativo é resultante da degeneração testicular, uma afecção ocasionada, entre muitos fatores, por qualquer processo que determine a elevação da temperatura testicular, como por exemplo, a dermatite escrotal, o excesso de gordura escrotal, edema, periorquite e elevação da temperatura ambiente com conseqüente estresse térmico (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Segundo Skinner e Louw (1996), a temperatura ambiente crítica para prejuízo da espermatogênese está entre 27°C e 32°C, e exposições contínuas a temperaturas excedendo 30°C podem determinar marcante efeito negativo sobre a produção espermática.

Clinicamente, na degeneração testicular leva inicialmente há flacidez e discreta diminuição do tamanho dos testículos, sendo que em etapas mais avançadas estes podem se tornar atrofiados, com tamanho reduzido, e com consistência firme à palpação. Histologicamente nota-se no túbulo seminífero diminuição da espermatogênese devido a morte das células da linhagem germinativa. As espermatogônias apresentam citoplasma vacuolizado e núcleo picnótico, as espermátides se degeneram e há o aparecimento de células gigantes multinucleadas resultantes da fusão de várias espermátides. Alguns túbulos podem mostrar ausência total do epitélio seminífero, membrana basal espessa e hialinizada e

proliferação de tecido conjuntivo fibroso, que invade os túbulos em casos mais avançados (VAN CAMP, 1997; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

O ejaculado de touros com degeneração testicular apresenta baixa motilidade e número moderado de células com defeitos morfológicos, como gotas protoplasmáticas proximais, diadema, vacúolos, e outros defeitos nucleares (WENKOFF, 1988; GARCIA, 2004; SOUZA, 2004). Em casos mais severos, além da oligozoospermia e da astenozoospermia pode ser detectado também aumento no número de espermatozoides com anomalias morfológicas, especialmente com defeitos de peça intermediária e cabeça. A presença de células primordiais da linhagem espermatogênica, células gigantes, medusas ou células germinativas multinucleadas no ejaculado indica danos severos ao epitélio seminífero (VAN CAMP, 1997; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). A presença de espermatozoides com formas teratológicas em quantidade no ejaculado é um indicativo de espermatogênese severamente prejudicada (JOHNSON, 1997; GARCIA, 2004; SOUZA, 2004).

Apesar da termorregulação escrotal ser um fenômeno complexo que depende entre outros fatores da temperatura e umidade ambiental, o escroto tem alguns importantes mecanismos que facilitam sua termorregulação. Sua posição pendular facilita a dissipação do calor e permite que os testículos sejam posicionados afastados da cavidade abdominal. A pele escrotal é fina, pouco pilosa, usualmente pobre em gordura subcutânea e possui um rico sistema de vasos sanguíneos e linfático, com diversas veias dispostas superficialmente, o que facilita a radiação do calor (KASTELIC, 1997). Ainda, a densidade de glândulas sudoríparas na pele escrotal dos touros é maior que em qualquer parte de seu corpo (BLAZQUEZ; MALLARD; WEDD, 1988).

O escroto possui ainda duas estruturas musculares que auxiliam na regulação da temperatura: a túnica dartos e o músculo cremaster. A túnica dartos é uma fina faixa de musculatura lisa sob a pele escrotal que possui inervação simpática e, portanto, movimentação involuntária. Ela contrai ou relaxa na dependência do ambiente estar frio ou quente, respectivamente. Já o músculo cremaster é um tecido muscular estriado que é contraído para aproximar os testículos da cavidade abdominal em situações de clima frio. Entretanto, ao contrário da túnica dartos, o cremaster não é capaz de manter a contração durante intervalos prolongados (SETCHEL, 1978; GARCIA, 2004; SOUZA, 2004).

O sistema vascular local compreende um conjunto de veias denominado “plexo pampiniforme” que aparece anatomicamente circundado a artéria testicular; a este grupo de estrutura denominamos “cone vascular”. O cone vascular tem como uma de suas funções promover a refrigeração do sangue arterial por mecanismos de contracorrente, determinando

perda de calor do sangue venoso. O cone vascular parece ser um importante local de radiação de calor, pois a pele que recobre o cone é usualmente a área mais quente do escroto (LUNSTRA; COULTER, 1996).

Touros de qualidade seminal aceitável e atividade reprodutiva satisfatória podem diferir quanto à capacidade de termorregulação testicular.

Sabe-se ainda que touros que passaram por estresse térmico testicular com consequente quadro de degeneração testicular leve a moderada, mesmo após o retorno da espermatogênese a normalidade, produziram espermatozóides com baixo potencial fertilizante e maior incidência de mortalidade embrionária (BURFENING; ULBERG, 1968).

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL, INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL UTILIZANDO SONDAS FLUORESCENTES POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

A manutenção da capacidade fertilizante do sêmen depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas espermáticas e isto dificulta o desenvolvimento de uma única técnica para a avaliação do potencial fertilizante que consiga avaliar todos esses atributos simultaneamente (GRAHAM, 2001; CELEGHINI et al., 2007). Porém, quando dados de vários métodos de avaliação espermática são utilizados em conjunto, consegue-se obter altas correlações com o potencial fertilizante da amostra de sêmen (GRAHAM, 2001). Recentes avanços na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies. Dessa forma, a funcionalidade de organelas dos espermatozóides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração. A integridade da membrana espermática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAN, 1992).

A integridade da membrana espermática pode ser determinada pelo uso do SYBR-14, um corante fluorescente que se liga ao DNA corando-o em verde. Este corante pode ser utilizado em combinação com o iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente de alta intensidade e impermeável à membrana plasmática, que se acopla somente ao DNA de

espermatozoides cuja membrana está danificada, corando o núcleo de vermelho (GARNER et al., 1999).

Durante muito tempo acreditou-se que a principal fonte de energia para o movimento do espermatozoide provinha da fosforilação oxidativa que ocorre na bainha mitocondrial da peça intermediária. Entretanto, a importância da mitocôndria para a motilidade espermática (um processo que gasta ATP), foi reconsiderada recentemente. Vários trabalhos demonstraram que os espermatozoides produzem a maior parte do ATP necessário para o batimento do flagelo por Glicólise (produção anaeróbia de ATP), e que esta produção ocorre mesmo em condições aeróbicas. Além disso, provou-se a existência de enzimas envolvidas na glicólise que estão ligadas à bainha fibrosa, e também a importância da glicólise para a hiperativação. Espermatozoides submetidos a drogas que interferem na fosforilação oxidativa na mitocôndria continuaram vivos e móveis (SILVA; GADELA, 2006; TURNER et al., 2006)

Apesar de tudo, as mitocôndrias provavelmente fornecem energia para a peça intermediária e para a cabeça do espermatozoide, energia necessária para a manutenção de importantes processos na membrana. Dentre esses, uma das atividades mais importantes é a manutenção do gradiente de Na^+/K^+ ao longo da membrana. A bomba de Na^+/K^+ também está envolvida indiretamente no transporte de outras substâncias e assim regula os gradientes químico e elétrico da membrana plasmática, que influenciam na sobrevivência espermática. Dessa forma, a integridade funcional da mitocôndria pode ser importante para a sobrevivência espermática no trato genital feminino e nas técnicas de reprodução assistida (SILVA; GADELA, 2006; RAPHAEL et al., 2007).

A capacidade de monitorar mudanças no potencial de membrana mitocondrial das células *in situ* pode ser crucial para elucidar mudanças da fisiologia celular em várias situações experimentais (CELEGHINI et al., 2007). Os reagentes mais comuns que são sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso do uso dessas sondas em células vivas deve-se ao fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (CELEGHINI et al., 2007).

A Rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica esta molécula é transportada para dentro de mitocôndrias de mitocôndrias ativas. O princípio dessa sonda é que ela só é transportada e acumulada em mitocôndrias funcionalmente ativas, em função do potencial de transmembrana. A sonda mitocondrial JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina), existe como um monômero com excitação e emissão no comprimento de onda verde (510-520 nm). Entretanto, ele também exibe um segundo pico na faixa do vermelho-laranja (590 nm). O fenômeno que produz a fluorescência vermelha-laranja

deve-se a formação de J-agregados. O JC-1 consegue identificar populações mitocondriais com diferentes potenciais de membrana. Mitocôndrias com alto potencial fluorescem em vermelho-laranja devido à formação de J-agregados (quando a concentração de JC-1 na mitocôndria aumenta, este corante forma agregados que fluorescem laranja), enquanto que aquelas mitocôndrias com baixo para médio potencial de membrana florescem em verde, devido ao fato do JC-1 no estado de monomérico fluorescem em verde (GARNER et al., 1997; GRAHAM, 2001; CELEGHINI, 2005; SILVA; GADELLA, 2006).

Devido ao fato da integridade acrossomal ser um parâmetro importante na morfologia espermática e no processo de criobiologia, vários procedimentos foram desenvolvidos visando a avaliação conjunta da viabilidade espermática e da integridade acrossomal (TAO et al., 1993; MAXWELL; JOHNSON, 1997).

Os corantes fluorescentes proporcionam avaliações mais objetivas das células espermáticas em relação aos métodos clássicos de coloração com microscopia óptica (GRAHAM et al., 1990). Além disto, os padrões de fluorescência são sempre muito consistentes (KAWAKAMI et al., 1993). As células espermáticas coradas com fluorescência podem ser avaliadas tanto quanto aos aspectos morfológicos como os funcionais sem a interferência do meio extracelular e a combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversos parâmetros celulares simultaneamente (GRAHAM et al., 1990; ERICSSON et al., 1993; TAO et al., 1993).

A aglutinina do *Pisum sativum* (PSA) tem sido proposta como um corante acrossomal baseado em conclusões empíricas e, quando aplicadas aos espermatozóides permeabilizados, fornece essencialmente os mesmos padrões de coloração que o antisoro para a enzima acrossomal acrosina. Essa lecitina de ervilha comestível possui uma afinidade a terminações α - D glucose e a resíduos de glicoproteínas α - D manose (TROWNBRIDGE, 1974). Mendonza et al. (1992) propuseram que a ligação aos grupos sacarídeos da glicoproteína proacrosina talvez seja o principal mecanismo molecular na coloração dos acrossomos espermáticos com PSA.

A membrana plasmática é responsável pelo mecanismo de manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMANN; PICKETT, 1987). Assim a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção da sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAM, 1992). O PI é um análogo do brometo de etídio, o qual passa através da membrana celular danificada e se liga ao DNA e RNA, produzindo

fluorescência vermelha no núcleo de células mortas. O PI é excluído de células intactas e mostra-se muito efetivo na identificação de células não viáveis (JONES; SENFT, 1985). Possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (ARRUDA et al.,2003)

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), localizado no Campus Administrativo de Pirassununga, SP. O período experimental estendeu-se de janeiro até abril de 2008.

4.1 ANIMAIS, MANEJO EXPERIMENTAL E ZOOTÉCNICO

Foram utilizados 10 touros da raça Nelore, PO, com idade em torno de 26 ± 2 meses. Os animais permaneceram em piquetes de dois hectares contendo capim *predominantemente Brachiaria brizantha*. A alimentação foi constituída por forragem verde (pastejo), suplementação mineral e água *ad libitum*, mimetizando as condições de pecuária extensiva no Brasil.

Cada touro passou por avaliação visual da condição corporal e pesagem com frequência quinzenal. O programa sanitário obedeceu às prerrogativas convencionais de prevenção e saúde animais para a espécie.

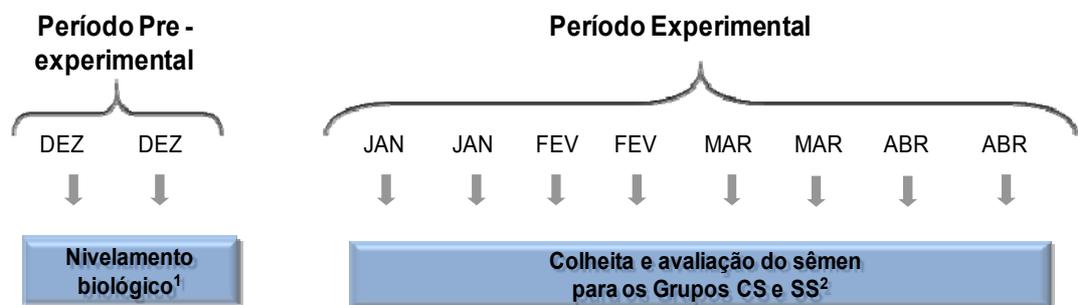
4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS AOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Previamente ao início do experimento, os animais foram mantidos durante 30 dias em regime de colheita quinzenal do sêmen para avaliação das características físicas e morfológicas, perfazendo duas colheitas (Figura 1). Os animais foram classificados segundo um índice reprodutivo (nota do animal) calculado com base na equação da figura 2, que

representou a soma dos valores das características espermáticas: nas porcentagens de defeitos morfológicos (defeitos maiores e menores) e de motilidade, sendo calculadas médias para cada uma destas características, por animal.

Cronologia do Experimento.

Ano 2007 - 2008



¹Uma colheita de sêmen a cada quinze dias, de todos os touros.

²CS: Grupo de touros Com Sombra.

SS: Grupo de touros Sem Sombra.

Figura 1 - Cronologia do Experimento

$$\text{NOTA DO ANIMAL} = (3 \times \text{TDMA}) + (2 \times \text{TDME}) + (1 \times \text{IM}), \text{ onde:}$$

Sendo: TDMA: Total de defeitos maiores;
TDME: Total de defeitos menores;
IM: Inverso da motilidade.

Figura 2 - Fórmula referente ao índice reprodutivo (nota do animal) a ser calculado para separação dos grupos experimentais (GARCIA, 2004)

Como a formação do índice considera totais de defeitos e o inverso da motilidade, entende-se que quanto menor a nota do touro no índice formulado, melhores suas características seminais. Com base nas notas obtidas, os animais foram classificados e distribuídos uniformemente em dois grupos ou tratamentos experimentais: CS= com disponibilidade de sombra artificial (n=5) e SS= sem disponibilidade de sombra (n=5) (Figura 1).

O grupo CS foi constituído por cinco touros mantidos em um piquete de dois hectares, no qual a disponibilidade de sombra foi criada artificialmente por meio de área preparada com *Sombrites* de polietileno, apresentando 90% de retenção da luz solar, com 10 m² de sombra por animal (TITTO et al., 2006) (Figura 3). Enquanto, o grupo SS foi constituído por cinco touros mantidos em outro piquete também com dois hectares, porém sem ter acesso à área de sombreado, sendo que ambos os grupos foram submetidos às mesmas condições e manejo nutricional e sanitário.



Figura 3 - Animais do grupo com sombreado artificial. a) Sombrite com 10 m² de sombra por animal, b) Animais fazendo uso da sombra

4.3 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTAL E DA UMIDADE RELATIVA DO AR

Foram monitoradas as temperaturas máxima, média e mínima, além da umidade do ar durante os 120 dias de duração do experimento, de janeiro até abril do ano 2008. As mensurações foram feitas em estação climatológica posicionada em 21°56'13" latitude Sul e 47°28'24" Oeste. As informações foram colhidas ininterruptamente de forma automatizada em intervalos regulares de 10 minutos durante todo o período do experimento. Para simplificação, os dados foram sistematizados e compilados em informações diárias. As temperaturas foram registradas em graus Celsius e a umidade do ar em porcentagem.

4.4 MENSURAÇÃO DO PERÍMETRO ESCROTAL E DA CONSISTÊNCIA TESTICULAR

Após o período pré-experimental, antes de cada colheita de sêmen, foram realizadas mensurações do perímetro escrotal e da consistência testicular de cada animal, a cada 15 dias, durante quatro meses. Para as mensurações testiculares foi utilizada fita específica, dotada de escala em centímetros e subdivisões em milímetros. A consistência testicular foi realizada por palpação e classificada em escala de 1 (mais flácida) a 5 (mais firme).

4.5 COLHEITA DO SÊMEN

Após o período pré-experimental, foram realizadas colheitas de sêmen de cada animal, a cada 15 dias, durante quatro meses, totalizando 80 ejaculados (10 touros x 8 colheitas = 80). As amostras de sêmen foram obtidas por eletroejaculação.

4.6 AVALIAÇÕES DO SÊMEN

Logo após a colheita o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração espermática, motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA – Computer-Assisted Sêmen Analysis), alterações morfológicas, integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial (Figura 4).

4.6.1 Determinação do Volume Seminal

O volume do sêmen foi determinado através do uso de tubo graduado de 15 mL com fração de 0,1 mL específico para a finalidade.

Ilustração Esquemática dos Procedimentos Experimentais.

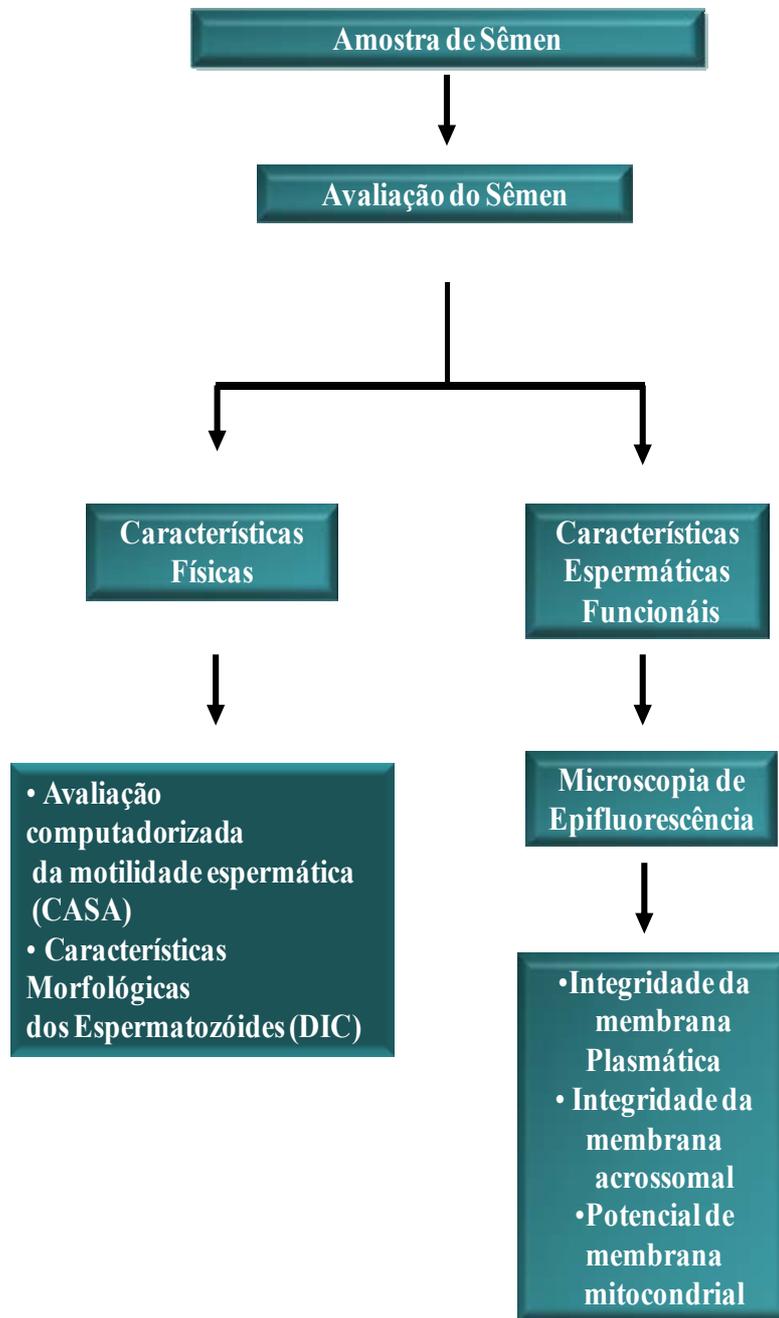


Figura 4 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais

4.6.2 Concentração Espermática

Para a concentração espermática o sêmen foi diluído na proporção de 1:100, ou seja, 10 μ L de sêmen: 990 μ L de formol salino tamponado. A leitura foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum em aumento de 400 x.

4.6.3 Avaliação Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis)

Para a avaliação da motilidade espermática pelo sistema computadorizado (CASA) uma amostra do sêmen foi diluída na concentração de 25 a 50 x 10⁶ espermatozóides/mL. Cinco microlitros da amostra foram colocados em câmara de leitura (2X-CEL[®] Dual Sided Sperm Analysis Chamber, 20 micron), a qual foi inserida no aparelho modelo 12.3 IVOS da Hamilton Thorne Biosciences que captura a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e envia os dados para um programa computacional responsável por realizar a análise, sendo previamente ajustado (*set up*) para a análise de sêmen bovino. No mínimo 10 campos foram selecionados para a leitura e análise. As variáveis analisadas foram, motilidade total, motilidade progressiva, velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimentos flagelares (BCF), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN), de acordo com Arruda (2000)

4.6.3.1 Trajeto da Célula

As células são rastreadas pela comparação sucessiva de *frames* (fotos). Um algoritmo *nearest-neighbor* seleciona o objeto móvel mais próximo. O trajeto é formado pela união das posições dos espermatozóides entre *frames* sucessivos com linhas retas. Para um

espermatozóide humano típico movendo-se a 50 $\mu\text{m/s}$ ou menos, a uma taxa de 30 *frames/s* o espermatozóide move-se menos do que 2 micrômetros entre os *frames*. Se esta distância excede 4 pixels, o trajeto é determinado como o fim, e um novo trajeto começa. Se o objeto desaparece por mais de 3 frames, o trajeto também é determinado como encerado.

4.6.3.2 Velocidade Progressiva (VSL)

Velocidade Progressiva (VSL) é a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso, definida em $\mu\text{m/s}$.

4.6.3.3 Velocidade Curvilinear (VCL)

Velocidade Curvilinear (VCL) é a velocidade média, em $\mu\text{m/s}$, de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula. É definida pela distância total entre cada posição do CB para uma dada célula durante a aquisição da imagem, dividida pelo tempo gasto. Sendo uma medida de velocidade curvilinear, seu valor depende da taxa de aquisição. Entretanto $VCL > VSL$.

4.6.3.4 Velocidade de Trajeto (VAP)

Velocidade de Trajeto (VAP) é a velocidade média ininterrupta do caminho da célula, em $\mu\text{m/s}$. É definida como a posição média aproximada do CB e fornece uma velocidade média do trajeto da célula. Um algoritmo aproximado é utilizado para reduzir o efeito de deslocamento lateral da cabeça e obter um trajeto mais representativo da posição do espermatozóide ao longo do trajeto. Representa a distância total ao longo do trajeto médio para cada célula dividido pelo tempo gasto.

Entretanto $VSL < VAP < VCL$.

4.6.3.5 Retilinearidade (STR)

Retilinearidade (STR) é o valor médio da proporção entre VSL/VAP . Determina a partida da linha de conduta da célula de uma linha reta.

4.6.3.6 Linearidade (LIN)

Linearidade (LIN) é o valor médio da proporção entre VSL/VCL . Determina a partida do percurso (*track*) da célula em uma linha reta.

4.6.3.7 Motilidade Progressiva

Três parâmetros são utilizados para classificação da velocidade de uma célula móvel: *MVV (Medium VAP Cut Off)*, *LVV (Low VAP Cut Off)* e *LVS (Low VSL Cut Off)*. As células são consideradas rápidas quando $VAP > MVV$, de velocidade média quando $LVV < VAP < MVV$, e lentas quando $VAP < LVV$ e/ou $VSL < LVS$.

Motilidade Progressiva é o número de células movendo-se com $VAP > MVV$ e Retilinearidade $STR > So$.

$$\text{Retilinearidade (STR)} = VSL / VAP$$

$$\text{Linearidade (LIN)} = VSL / VCL$$

4.6.3.8 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH)

A Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) corresponde à largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move. O IVOSCEROS determina o ALH como o valor máximo da distância de qualquer ponto sobre o trajeto (*track*) da linha do percurso (*path*) média correspondente, multiplicado por dois, definindo a largura total.

4.6.3.9 Freqüência de Batimentos (BCF)

Freqüência de Batimentos (BCF) é definida como a freqüência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido, sendo determinada em Hertz (ARRUDA, 2000).

4.6.4 Características Morfológicas dos Espermatozóides

Para as avaliações das características morfológicas dos espermatozóides o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado, previamente aquecido (37° C), foi preparada uma câmara úmida, com uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula e a avaliação realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1.000 x sob microscopia de contraste de interferência diferencial DIC (Nikon, modelo 80i).

Os defeitos maiores dos espermatozóides foram representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal e contorno anormal de cabeça), defeitos de peca intermediaria (fibrilação, fratura total, fratura parcial, edema e pseudogotas), defeitos de cauda (cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa), além de defeitos de acrossomo, pouch formation e gota protoplasmática proximal. A somatória da ocorrência desses defeitos

contados em uma amostra do ejaculado resulta em um índice denominado “total de defeitos maiores”.

Os defeitos menores dos espermatozoides foram representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal), defeitos de implantação (abaxial, retroaxial, oblíqua), defeitos de cauda (cauda dobrada, cauda enrolada) e gota protoplasmática distal. A somatória da ocorrência desses defeitos contados em uma amostra do ejaculado resulta em um índice denominado “total de defeitos menores”.

O total de anomalias foi dado pela somatória de defeitos maiores e do total de defeitos menores encontrados em um ejaculado.

4.6.5 Avaliação do Potencial Mitocondrial e Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal por Microscopia de Epifluorescência (celeghini et al., 2007)

A função mitocondrial e a integridade das membranas plasmática e acrossomal foram avaliadas pela associação das sondas JC-1, PI e FITC-PSA, respectivamente. Para esta análise foram colocados em um microtubo 150 μL de uma amostra do sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL, adicionados 3 μL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 2 μL de JC-1 (153 μM em DMSO) e 50 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$ em DPBS). A amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C . Após a incubação uma gota (7 μL) desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655), com aumento de 1.000 x.

As células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida:

- Membrana Plasmática Intacta, Membrana Acrossomal Intacta e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (PIAIC);

- Membrana Plasmática Intacta, Membrana Acrossomal Intacta e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (PIAIS);
- Membrana Plasmática Intacta, Membrana Acrossomal Lesada e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (PIALC);
- Membrana Plasmática Intacta, Membrana Acrossomal Lesada e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (PIALS);
- Membrana Plasmática Lesada, Membrana Acrossomal Intacta e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (PLAIC);
- Membrana Plasmática Lesada, Membrana Acrossomal Intacta e com baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (PIAIS);
- Membrana Plasmática Lesada, Membrana Acrossomal Lesada e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (PLALC);
- Membrana Plasmática Lesada, Membrana Acrossomal Lesada e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (PLALS).

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2004), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderem às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [Log (X+1)]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos forem significativas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

Tabela 1 - Modelo matemático de análise de variância em delineamento em blocos adicionados do complemento de delineamento medidas repetidas no tempo determinado para o experimento – Pirassununga, 2009

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Tratamento	1
Bloco	4
Resíduo A	4
Parcela	9
Tempo	7
Tempo * tratamento	7
Tempo * bloco	28
Resíduo B	28
Sub-parcela	79

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados de cada variável estudada estão apresentados em forma de gráficos. Cada gráfico contém as informações sobre as oito colheitas do grupo de touros dos tratamentos Sem Sombra (SS) ou Com Sombra (CS).

5.1 DADOS CLIMÁTICOS

Durante o período compreendido pelo trabalho, a temperatura ambiental máxima alcançada foi de 34,2°C, a menor temperatura registrada foi de 13,2°C, e a temperatura média foi de 24,6°C. O perfil diário das temperaturas máximas, médias e mínimas pode ser observado no gráfico 1.

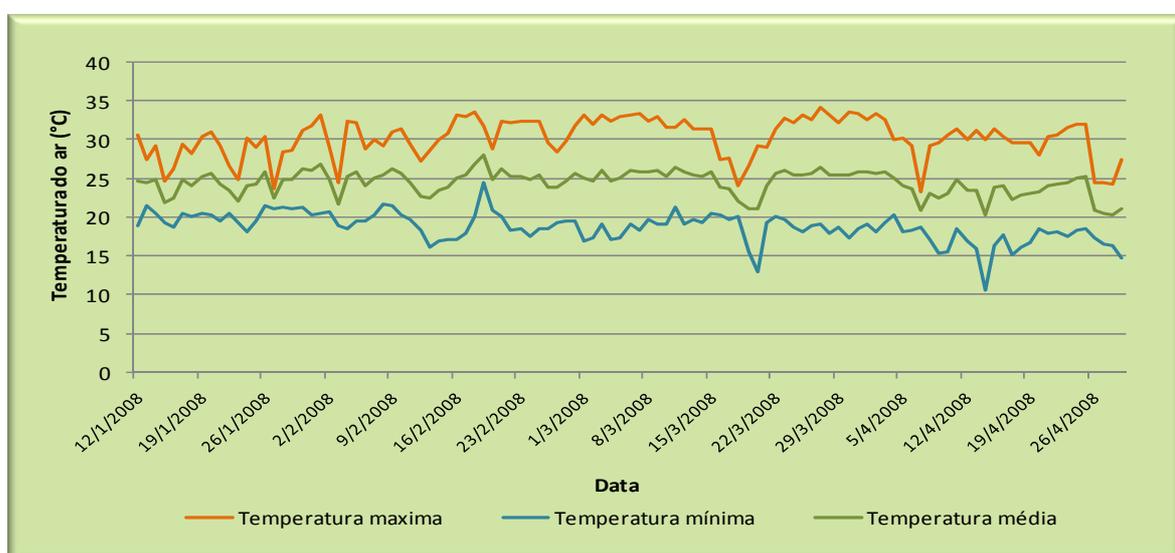


Gráfico 1 - Temperaturas máximas, mínimas e médias durante o período de 12/01/2008 a 30/04/2008 – Pirassununga – SP, 2009

A umidade relativa do ar média durante o período experimental foi de 78,3%, tendo variado entre a máxima de 95,5% e mínima de 66,1%. O perfil diário da umidade relativa do ar está expresso no gráfico 2.

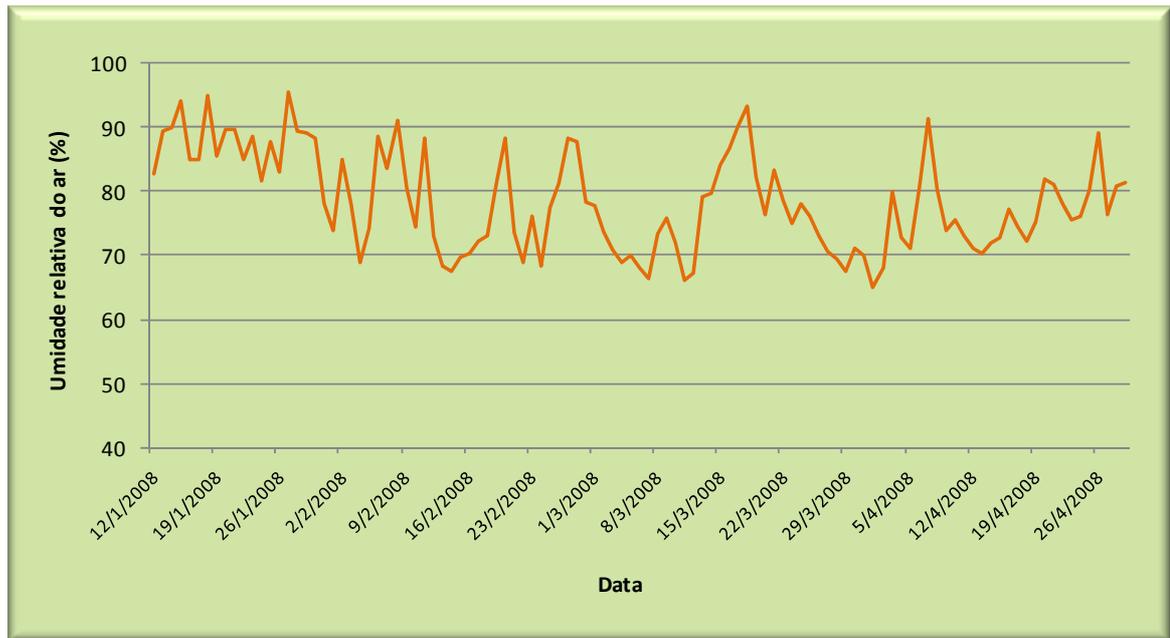


Gráfico 2 - Valores das médias da umidade relativa do ar durante o período de 12/01/2008 a 30/04/2008 – Pirassununga – SP, 2009

5.2 PERÍMETRO ESCROTAL

As médias das mensurações do **Perímetro Escrotal** estão apresentadas no gráfico 3. As médias dos perímetros escrotais durante o transcorrer do experimento foi de 29,8 a 31,1 cm para os touros mantidos em ambiente com acesso a sombra, e, de 30,9 a 32,2 cm, para os touros mantidos em ambiente sem acesso a sombra, de modo que não foi observado efeito estatístico para o tratamento no tempo do experimento ($P>0,05$).

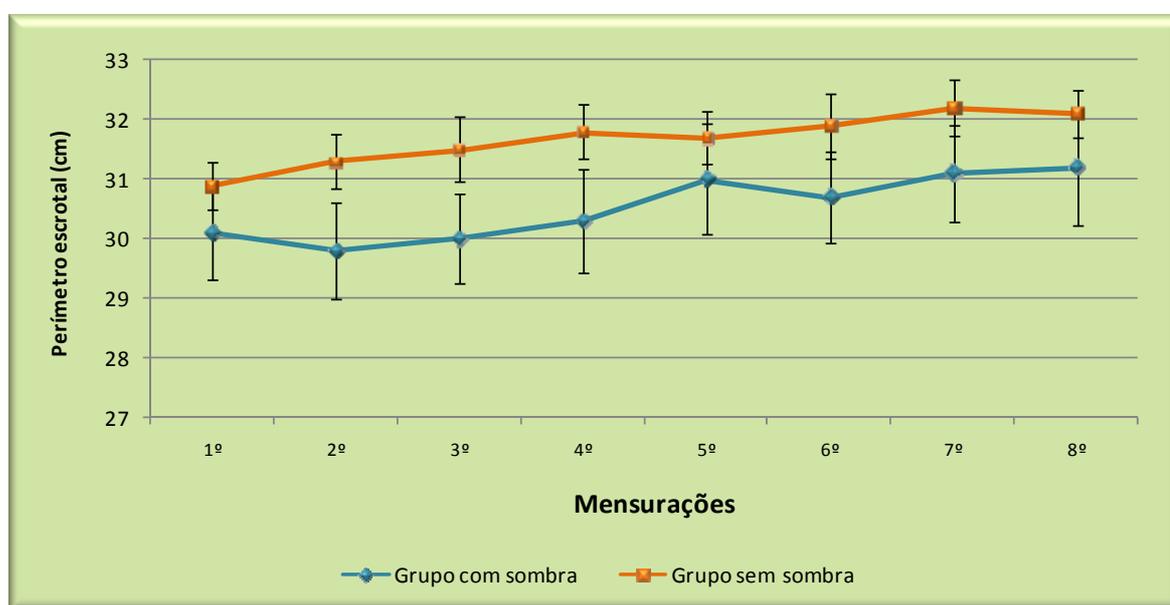


Gráfico 3 - Valores das médias (\pm erros padrão) do perímetro escrotal (CE) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes Com Sombra (CS) ou Sem Sombra (SS) - Pirassununga - 2009

5.3 CONSISTÊNCIA TESTICULAR

As médias da **Consistência Testicular** dos animais estão apresentadas no gráfico 4. A consistência testicular média dos grupos durante o transcorrer do experimento foi de 3,6 a 4,1 para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra, e, de 3,7 a 4,1 para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso a sombra, numa escala de 1 a 5 onde 5 é a consistência mais firme e 1 a consistência mais flácida.

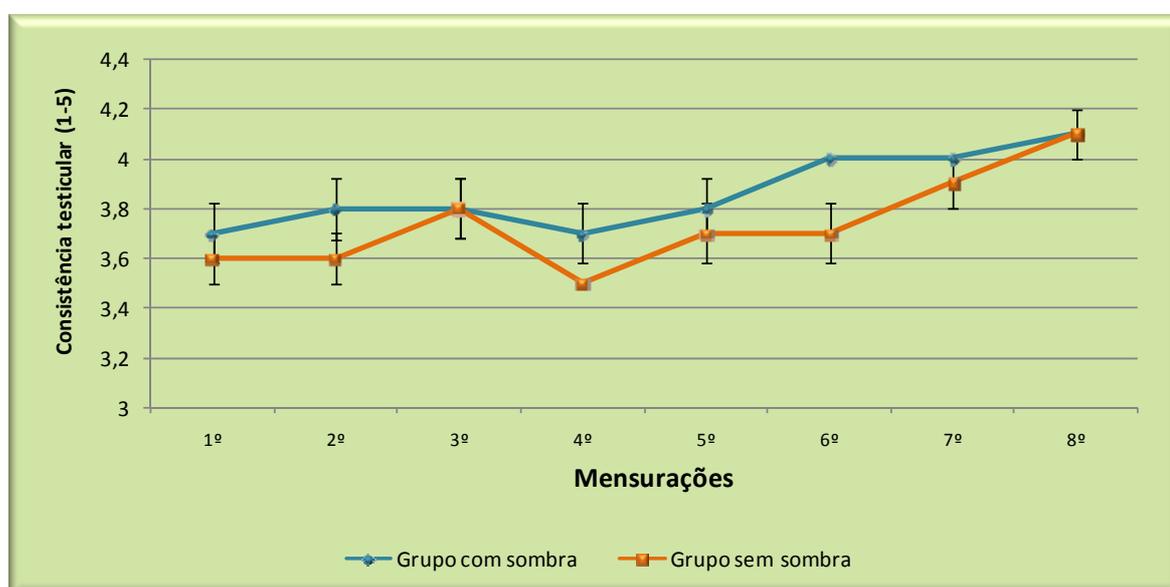


Gráfico 4 - Valores das médias (\pm erros padrão) da consistência testicular de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.4 TOTAL DE DEFEITOS MAIORES

As médias relativas ao **Total de Defeitos Maiores** nos ejaculados no grupo de touros mantidos em ambiente com acesso a sombra variaram de 10,5 a 16,0%, e, no grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra de 7,0 a 14,5%. Como observado no gráfico 5, no presente experimento não houve efeito do tempo no tratamento para ambos os grupos ($P>0,05$).

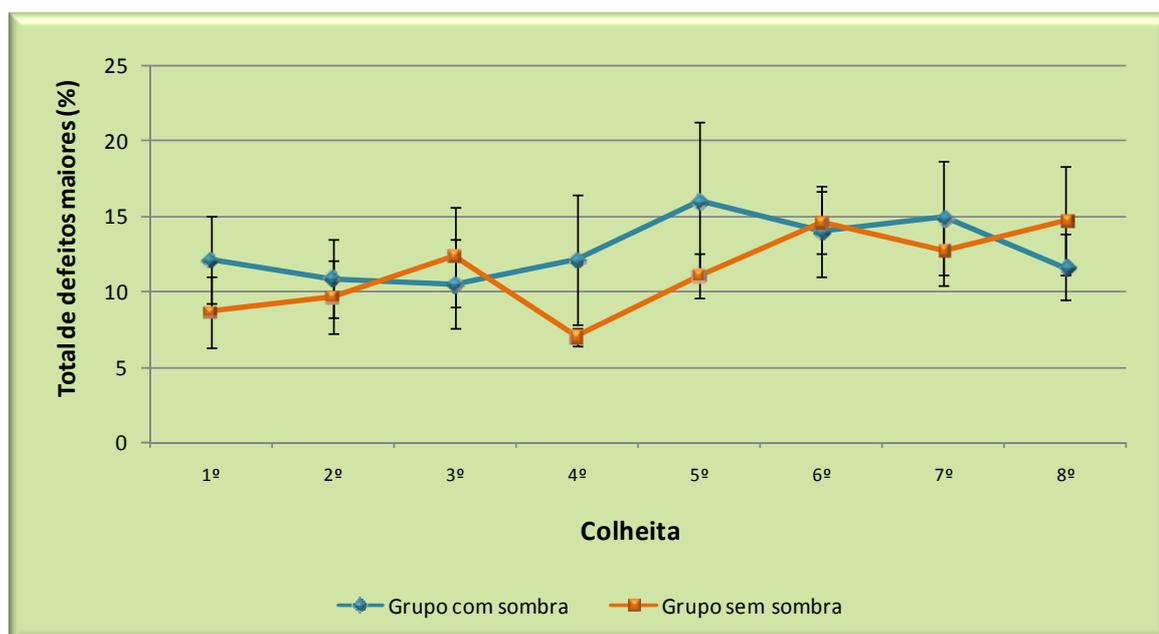


Gráfico 5 - Valores das médias (\pm erros padrão) do total de defeitos maiores dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009

5.5 TOTAL DE DEFEITOS MENORES

As médias relativas ao **Total de Defeitos Menores** nos ejaculados dos cinco touros mantidos em um ambiente com acesso à sombra variaram de 5,5 a 21,5%, e, dos cinco touros mantidos em ambiente sem acesso à sombra oscilaram de 2,0 a 11,6%, constatando que não houve interação entre tempo e tratamento, sendo então, valores similares e não diferentes estatisticamente ($P>0,05$), gráfico 6.

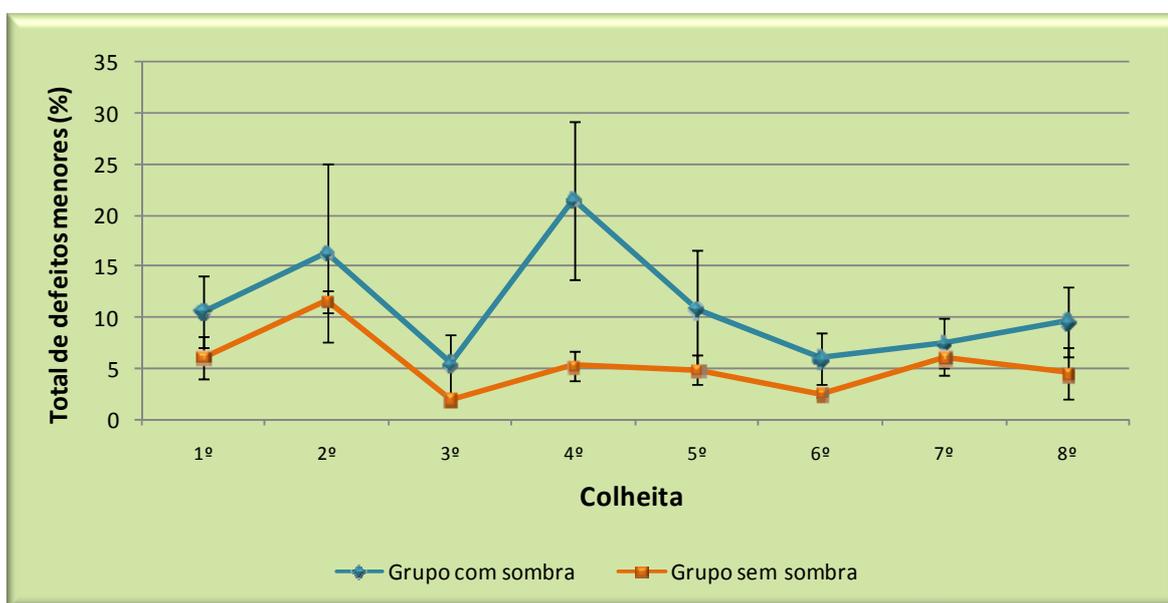


Gráfico 6 - Valores das médias (\pm erros padrão) do total de defeitos menores dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga - 2009

5.6 TOTAL DE DEFEITOS ESPERMÁTICOS

O **Total de Defeitos Espermáticos** foi obtido pela somatória do total de defeitos maiores e do total de defeitos menores. As médias de defeitos totais apresentadas, por colheita, desde o início do tratamento até o final para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra variaram de 12,3 a 21,2 %, e, do grupo de touros mantidos em ambiente com acesso a sombra variaram de 16 a 33,6 %. No presente experimento não houve efeito de interação entre tempo e tratamento ($P>0,05$) para esta variável, como observado no gráfico 7.

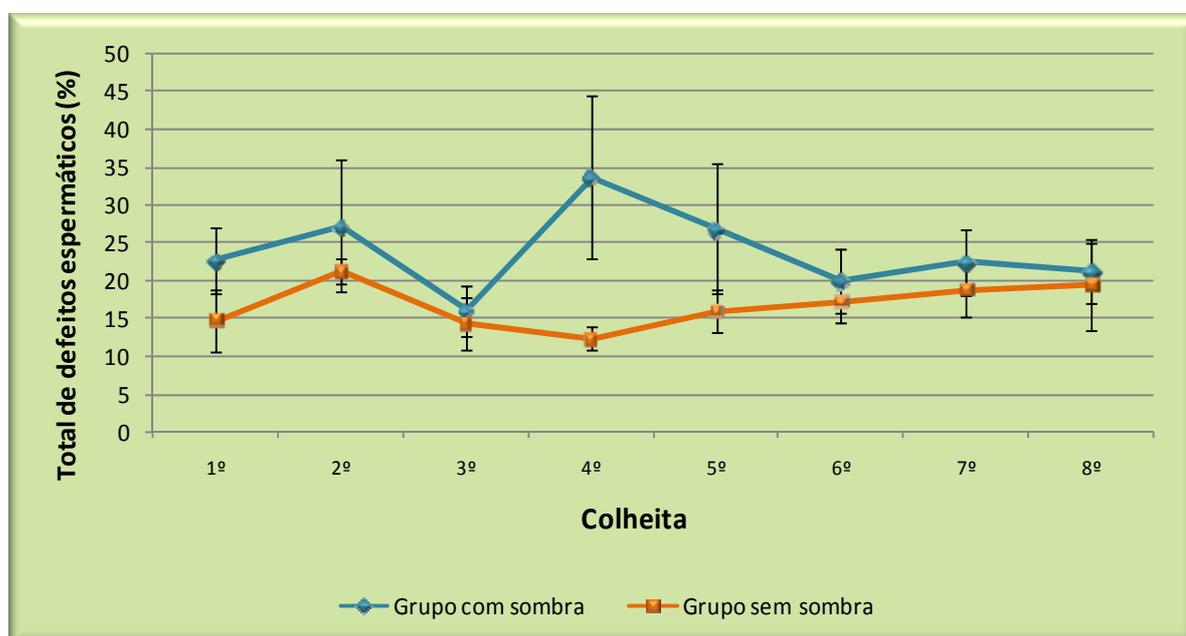


Gráfico 7 - Valores das médias (\pm erros padrão) do total de defeitos espermáticos de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS - CASA)

5.7.1 Motilidade Total

Os valores das médias de **Motilidade Total** das amostras de sêmen do grupo de touros mantidos em ambiente sem acesso a sombra variaram de 84,7 a 92,1%, e, do grupo de touros mantidos em ambiente com sombra os valores foram de 82,3 a 91,5%, como observado no gráfico 8; de modo que, não foi observado efeito estatístico para o tratamento no tempo do experimento ($P>0,05$).

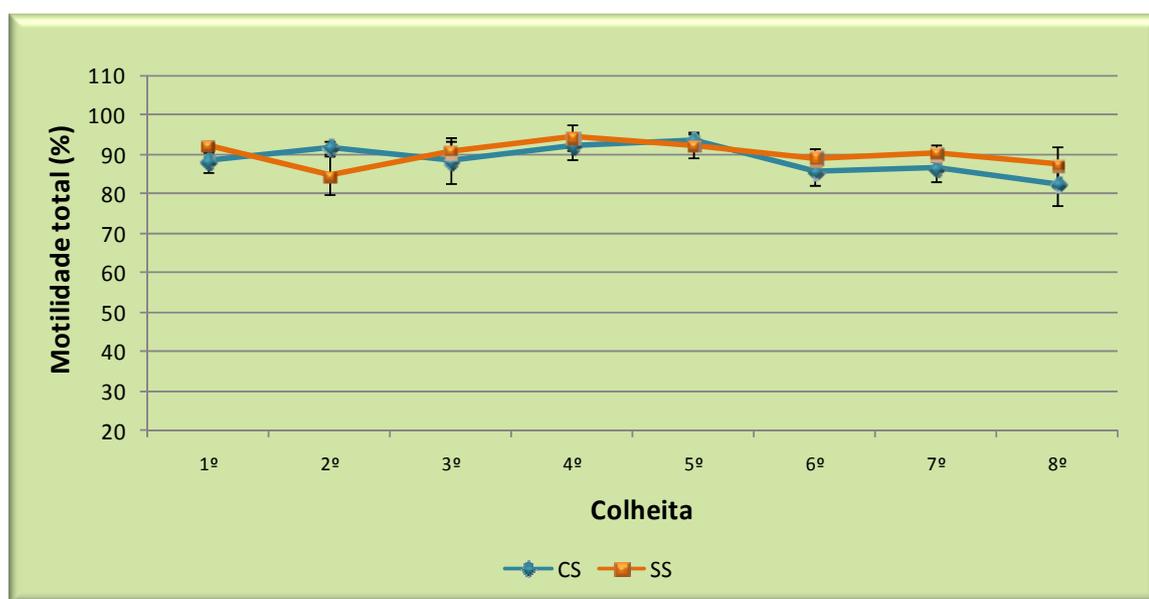


Gráfico 8 - Valores das médias (\pm erros padrão) da motilidade total dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.2 Motilidade Progressiva

As médias de **Motilidade Progressiva** das amostras de sêmen do grupo de touros mantidos em ambiente sem acesso à sombra oscilaram de 72,3 a 83,3%, e, para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra variaram de 70,6 a 82,6%, como observado no gráfico 9. Os valores são próximos e não diferentes estatisticamente ($P>0,05$).

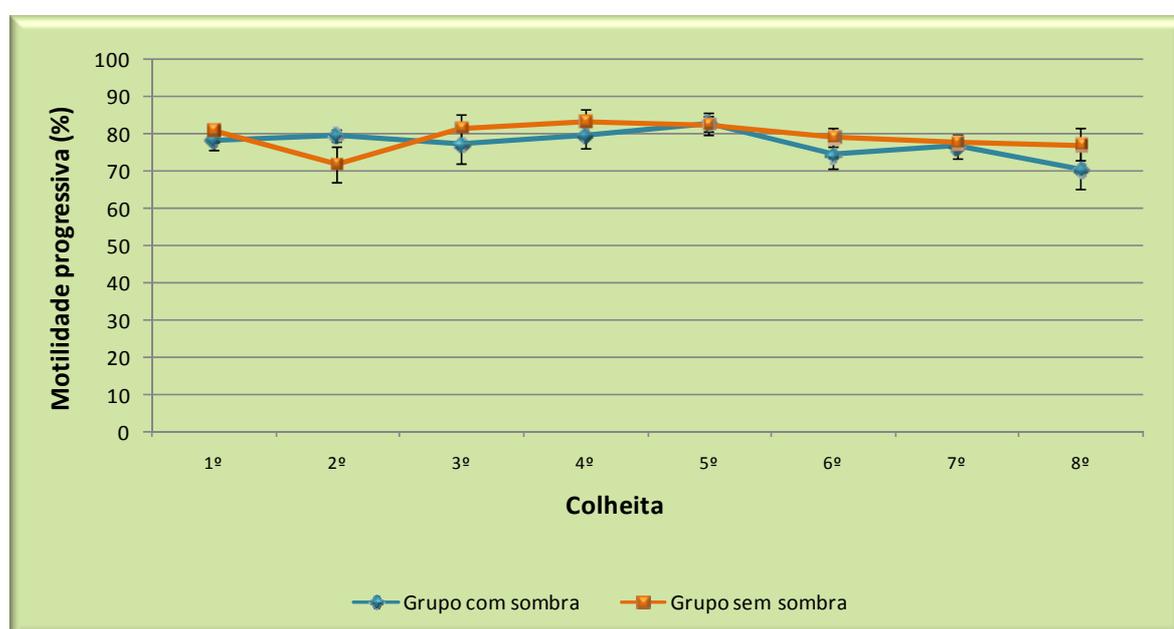


Gráfico 9 - Valores das médias (\pm erros padrão) da motilidade progressiva dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.3 Velocidade do Trajeto (VAP)

As médias de **Velocidade do Trajeto** das amostras de sêmen do grupo de touros mantidos em ambiente sem acesso à sombra os valores oscilaram de 101,1 a 108,8 $\mu\text{m/s}$, assim, para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra os valores oscilaram de 111,5 a 122,4 $\mu\text{m/s}$, gráfico 10. Os valores são próximos e não diferentes estatisticamente ($P>0,05$).

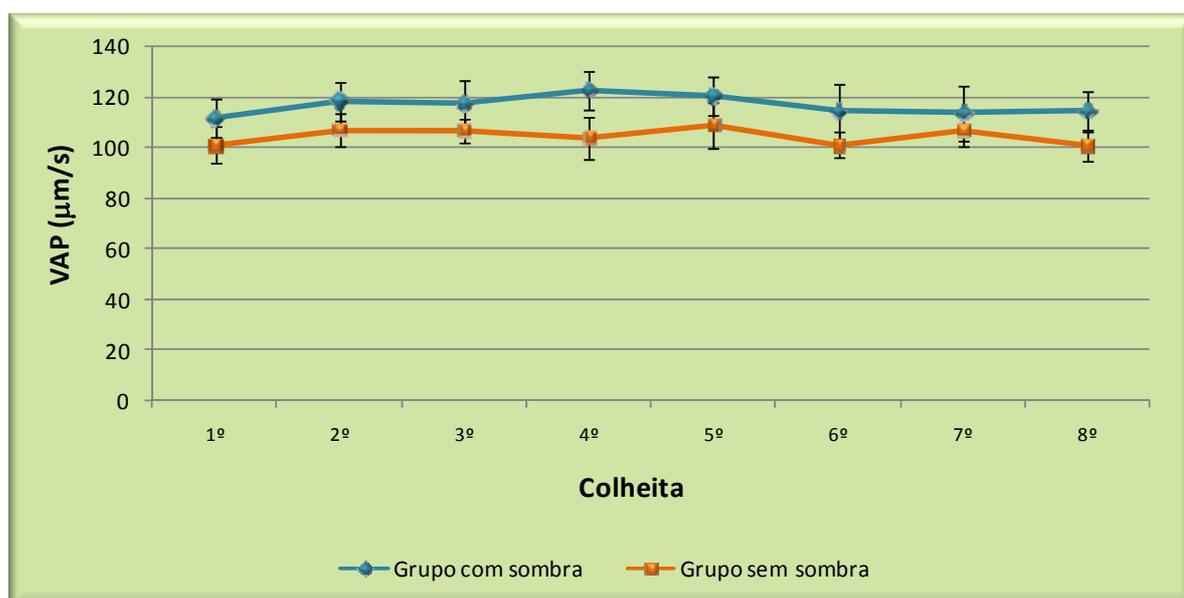


Gráfico 10 - Valores das médias (\pm erros padrão) da velocidade de trajeto (VAP) dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.4 Velocidade Progressiva (VSL)

As médias da **Velocidade Progressiva** das amostras de sêmen do grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra oscilaram de 87,7 a 94,4 $\mu\text{m/s}$, já, para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra os valores variaram de 97,7 a 103,4 $\mu\text{m/s}$, gráfico 11. Os valores são próximos e não diferentes estatisticamente ($P>0,05$).

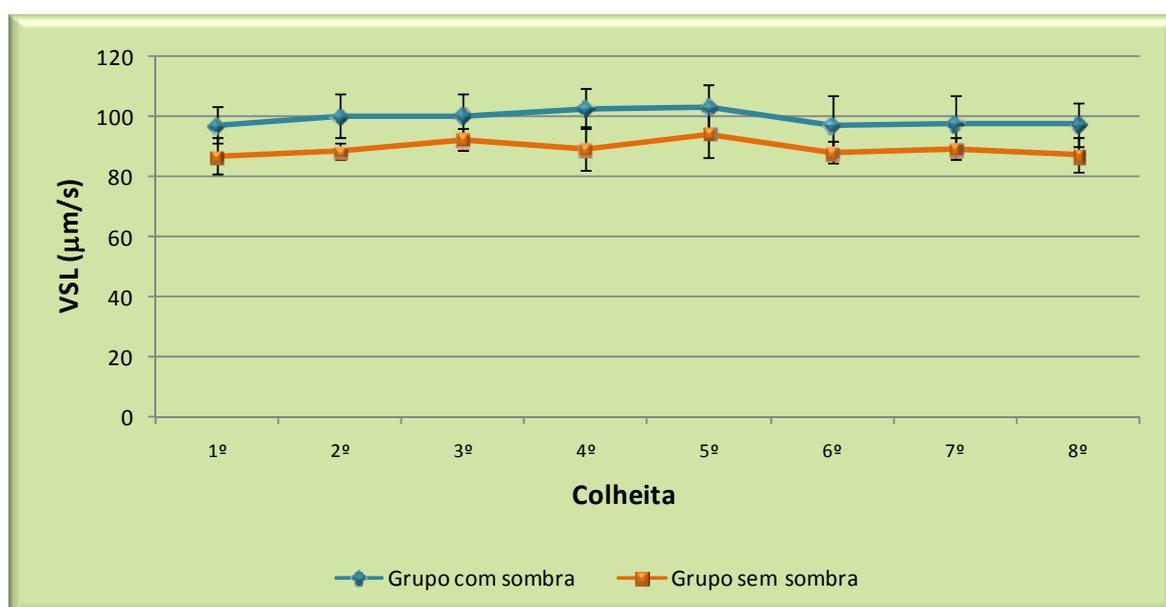


Gráfico 11 - Valores das médias (\pm erros padrão) da velocidade progressiva (VSL) dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.5 Velocidade Curvilinear (VCL)

As médias da **Velocidade Curvilinear** das amostras de sêmen do grupo de touros mantidos em ambiente sem acesso à sombra foram de 146,6 a 170,9 $\mu\text{m/s}$, já, para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra os valores foram de 162,3 a 196 $\mu\text{m/s}$, gráfico 12. Os valores são próximos e não diferentes estatisticamente ($P>0,05$).

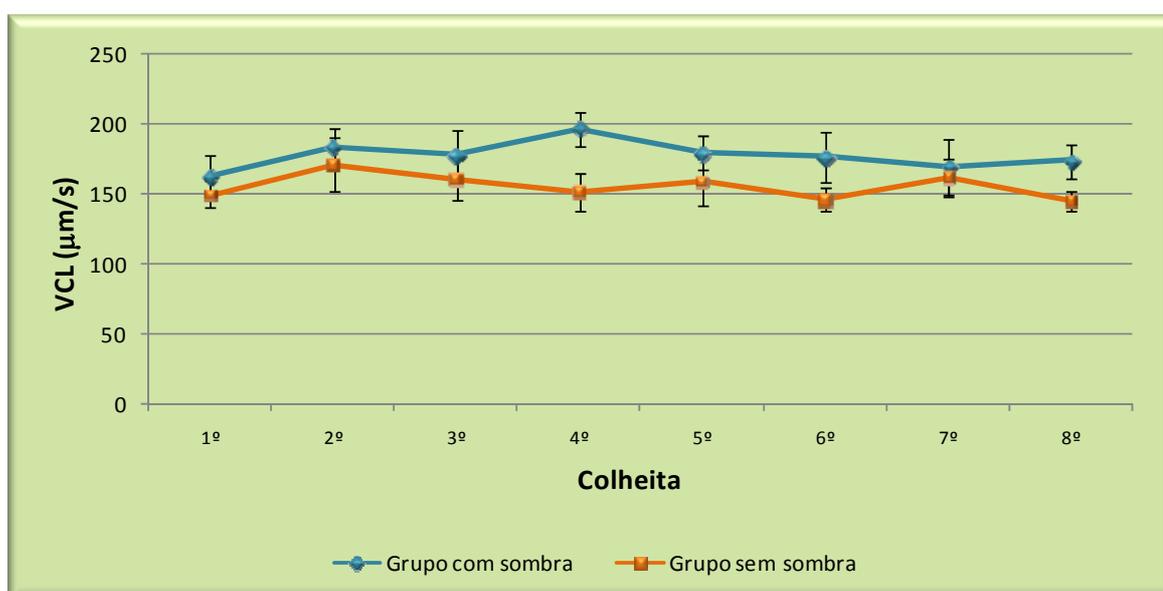


Gráfico 12 - Valores das médias (\pm erros padrão) da velocidade curvilinear (VCL) dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH)

Para a **Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça** não foi observada interação entre tempo e tratamento, os valores médios para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra foram de 5,4 a 6,04 $\mu\text{m/s}$, e, para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra foram de 5,5 a 6,8 $\mu\text{m/s}$, gráfico 13. Valores próximos e não diferentes estatisticamente ($P>0,05$).

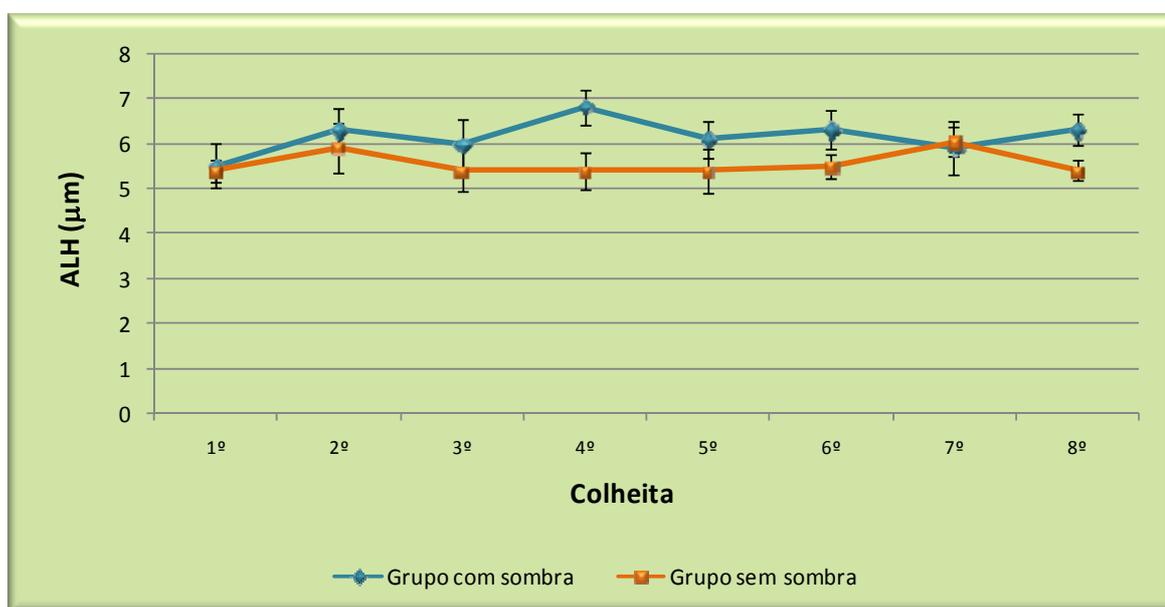


Gráfico 13 - Valores das médias (\pm erros padrão) da amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.7 Freqüência de Batimentos (BCF)

Os valores de **BCF** variaram no grupo de touros mantidos em ambiente sem acesso a sombra de 34,8 a 38,1 Hertz (Hz), no grupo de touros mantidos em ambiente com acesso a sombra os valores oscilaram de 35 a 37,9 Hz (Gráfico 14). Não foi observado efeito significativo para o tratamento no tempo do experimento ($P>0,05$).

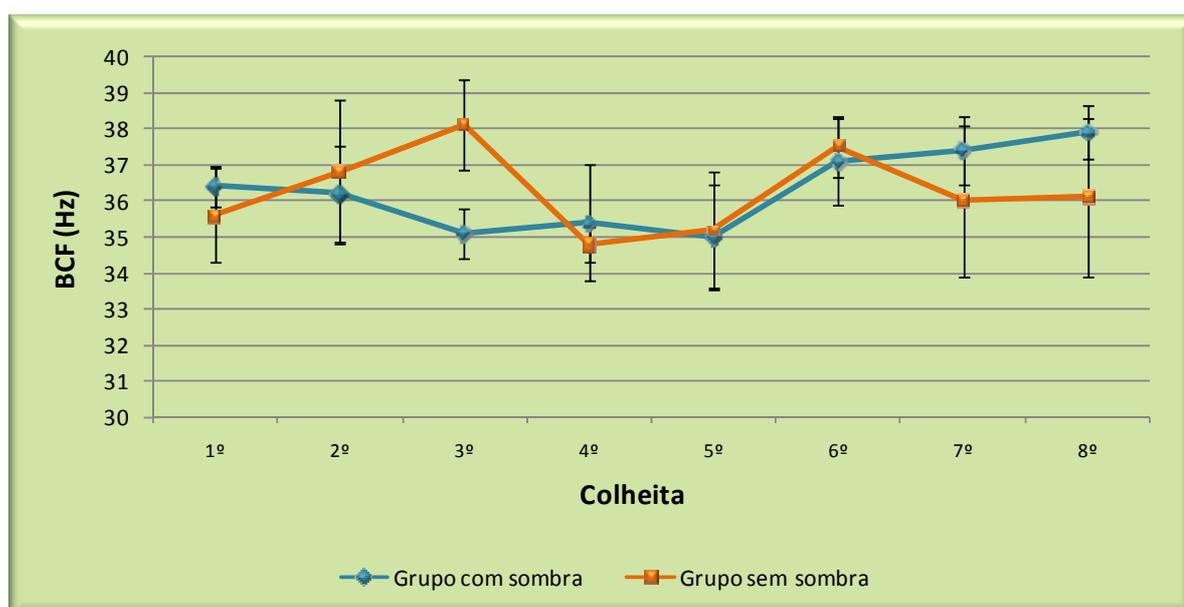


Gráfico 14 - Valores das médias (\pm erros padrão) da freqüência de batimentos flagelares (BCF) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.8 Retilinearidade (STR)

Não foi observada interação entre tempo e tratamento para a **Retilinearidade**. Os valores médios da Retilinearidade oscilaram para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra de 83,2 a 87,5%, já, para o grupo touros mantidos em ambiente com sombra variaram de 84,1 a 87,5% (Gráfico 15). Não foi observado efeito estatístico significativo para o tratamento no tempo do experimento ($P > 0,05$).

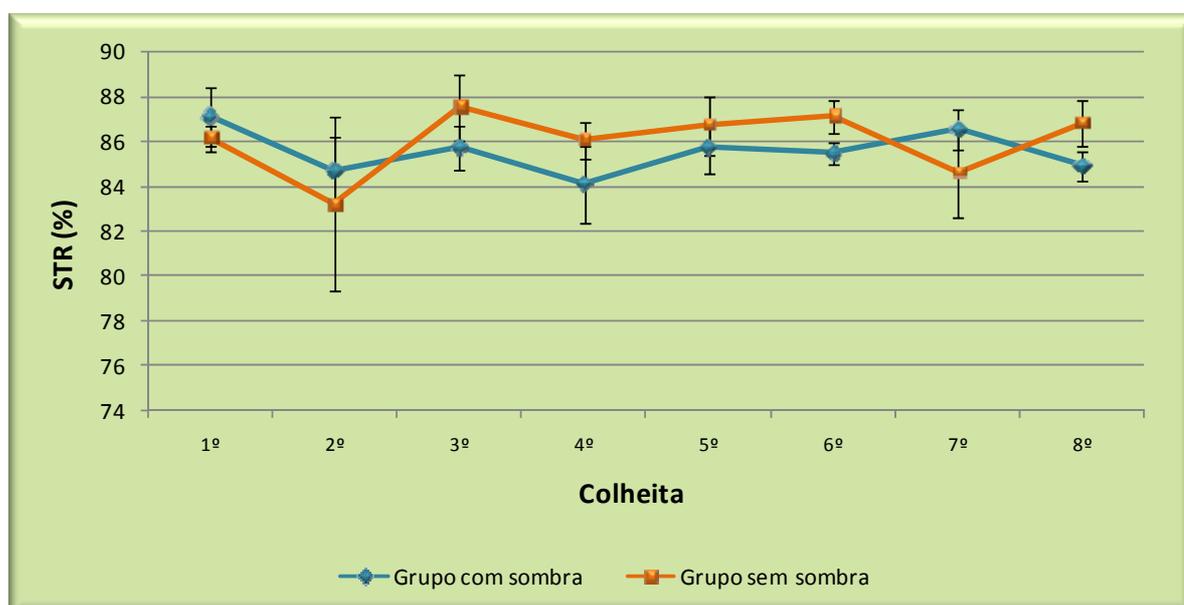


Gráfico 15 - Valores das médias (\pm erros padrão) da retilinearidade (STR) dos espermatozóides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.7.9 Linearidade (LIN)

Para a variável **Linearidade** os valores das médias para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra oscilaram de 57,4 a 63,8%, para o grupo de touros mantidos em ambiente com sombra variaram de 56,4 a 63,2% (Gráfico 16). Não foi observado efeito estatístico significativo para o tratamento no tempo do experimento ($P>0,05$).

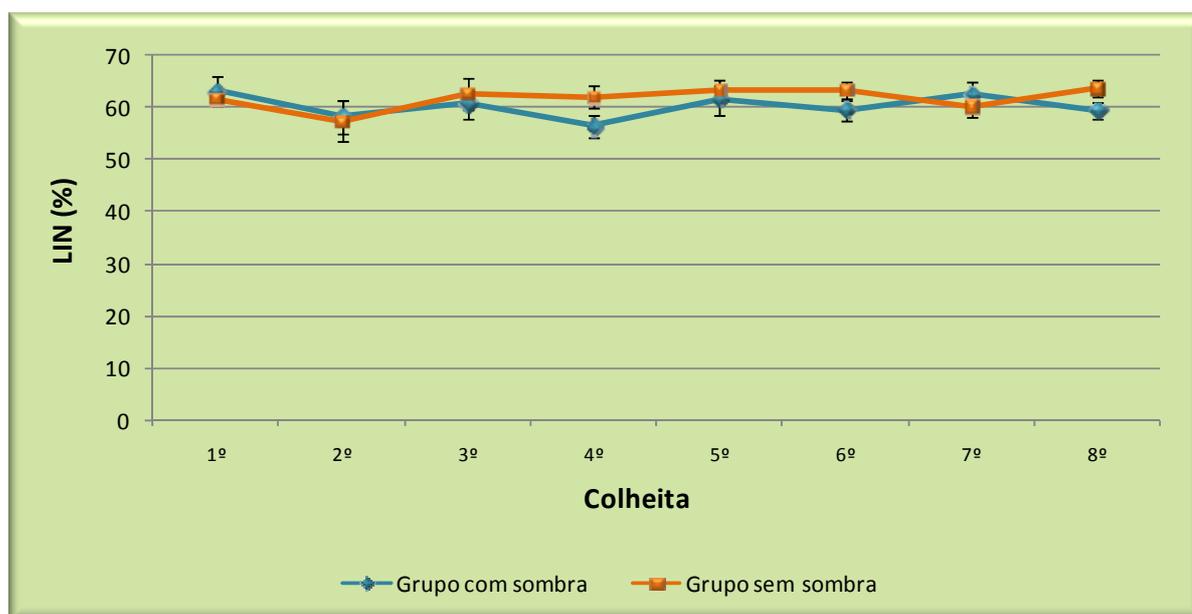


Gráfico 16 - Valores das médias (\pm erros padrão) da linearidade (LIN) dos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL E INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

O potencial mitocondrial e a integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides foram avaliados pela associação das sondas JC-1, PI, e FITC-PSA, respectivamente, como apresentado na figura 5.

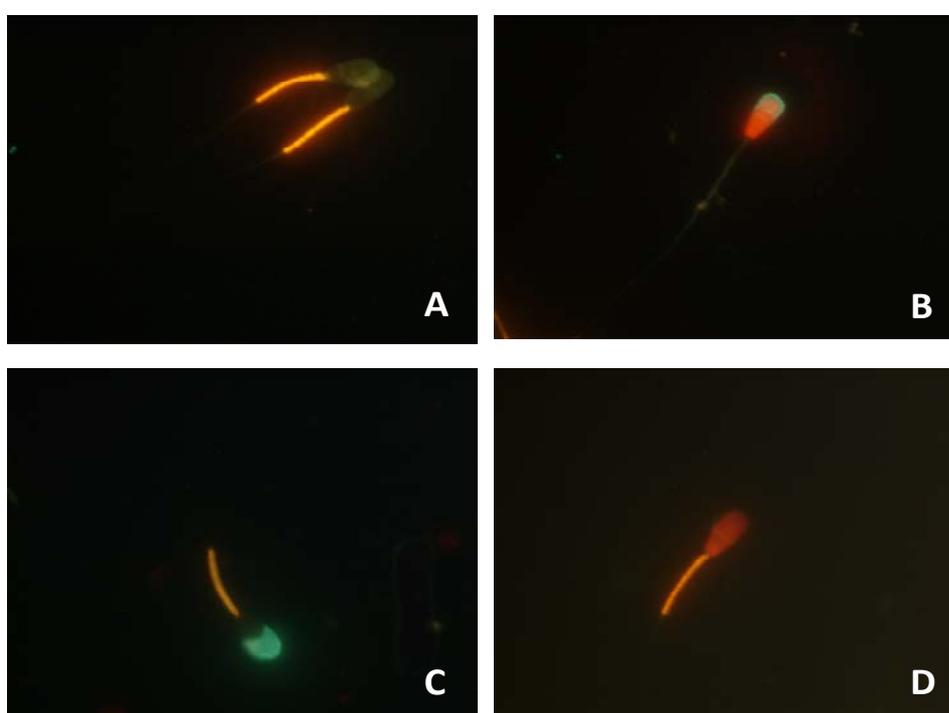


Figura 5 - Fotomicrografia de epifluorescência de células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (aumento de 1000x): **A.** células espermáticas com alto potencial mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal; **B.** célula espermática com baixo potencial mitocondrial (mitocôndrias verdes), com membrana plasmática rompida (núcleo vermelho) e com membrana acrossomal rompida (verde); **C.** célula espermática com alto potencial mitocondrial, com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal rompida (mitocôndrias vermelho-laranja); **D.** célula espermática com alto potencial mitocondrial, com membrana plasmática rompida e membrana acrossomal íntegra

5.8.1 Integridade da Membrana Plasmática Espermática

Ao analisar as médias das células espermáticas com **Integridade da Membrana Plasmática (PMI)** para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra os valores foram de 59,2 a 75,6%, e, de 66,0 a 74,8 %, já, para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso a sombra, gráfico 17. Valores parecidos e sem diferença estatística ($P>0,05$).

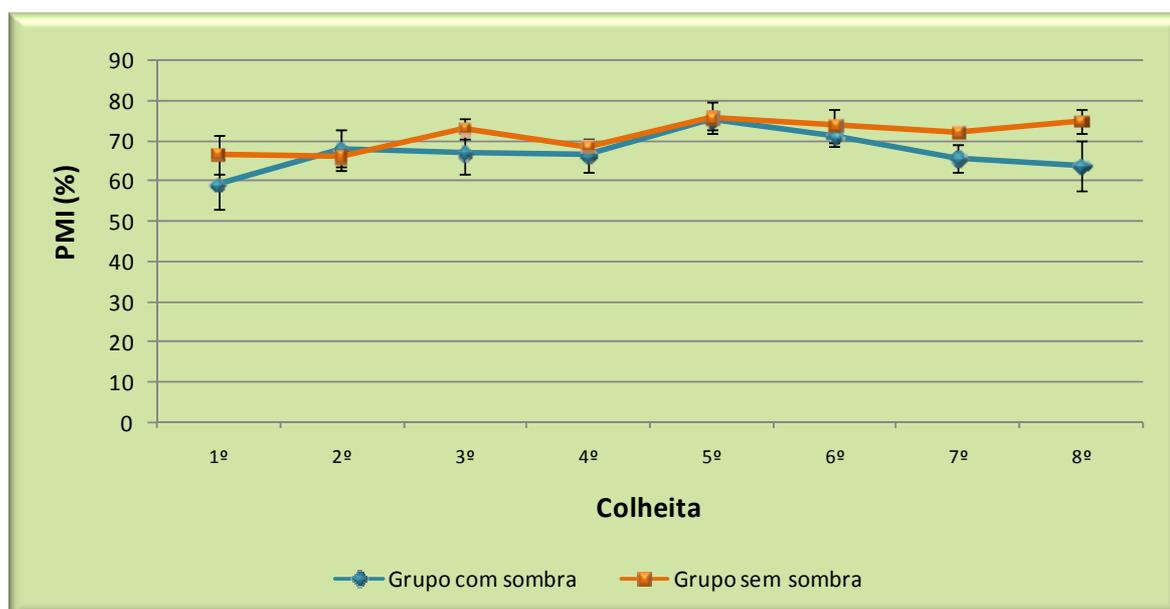


Gráfico 17 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra (PMI) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.8.2 Integridade da Membrana Acrossomal Espermática

Os valores médios da quantidade de espermatozóides com **Membrana Acrossomal Íntegra (AI)** para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra oscilou de 72,5 a 84,2%, e, de 68,3 a 79,0% para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso a sombra, não sendo observadas diferenças estatísticas significativas, gráfico 18 ($P>0,05$)

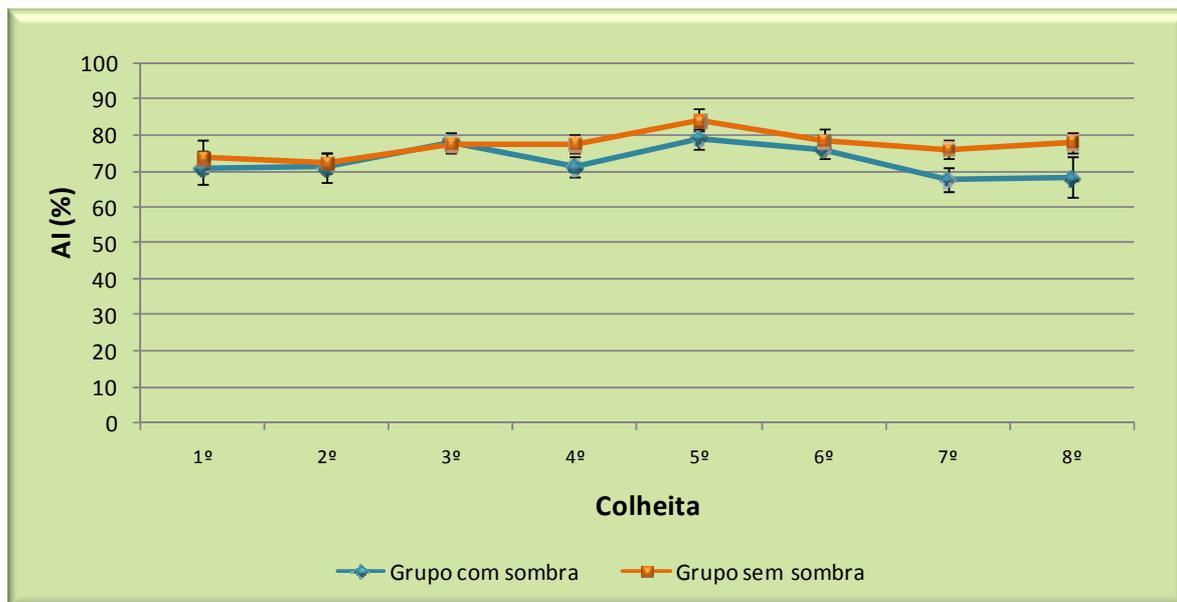


Gráfico 18 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozóides com acrossomo íntegro (AI) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.8.3 Potencial Mitocondrial Espermático

As médias das porcentagens de espermatozoides com **Alto Potencial Mitocondrial (PM)** para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra foi de 69 a 84,6%, e, de 62,1 a 83,5% para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra, $p>0,05$ (Gráfico 19).

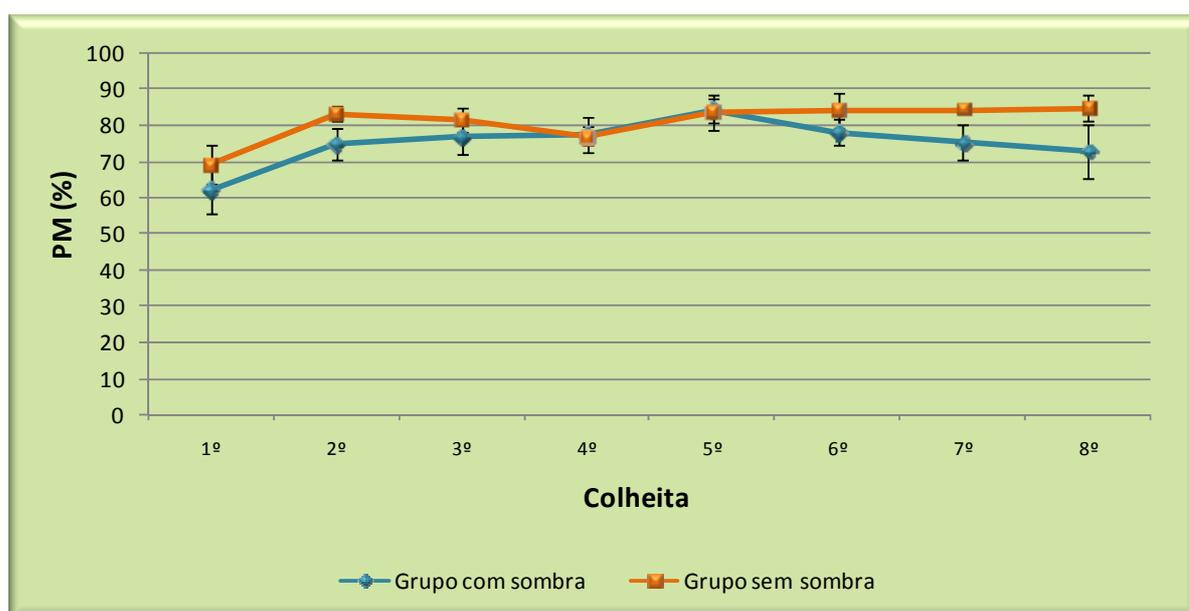


Gráfico 19 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozoides com alto potencial mitocondrial (PM) de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.8.4 Células com Alto Potencial Mitocondrial, Integridade da Membrana Plasmática e Acrossomal

Os valores médios da porcentagem de células com alto potencial mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal (**PIAIC**) no grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra, variaram de 65,1 a 74,7%, já, no grupo de touros com sombra os valores oscilaram de 58,1 a 75,1%, gráfico 20. A variação dos valores para esta variável não demonstraram uma diferença estatística significativa ($P>0,05$).

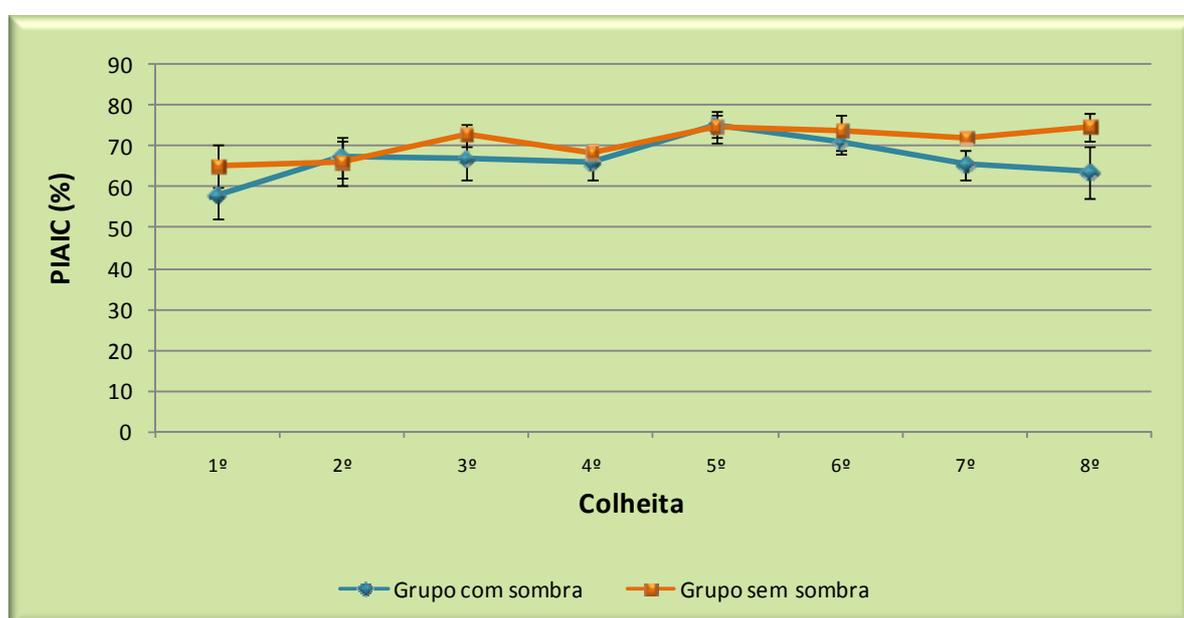
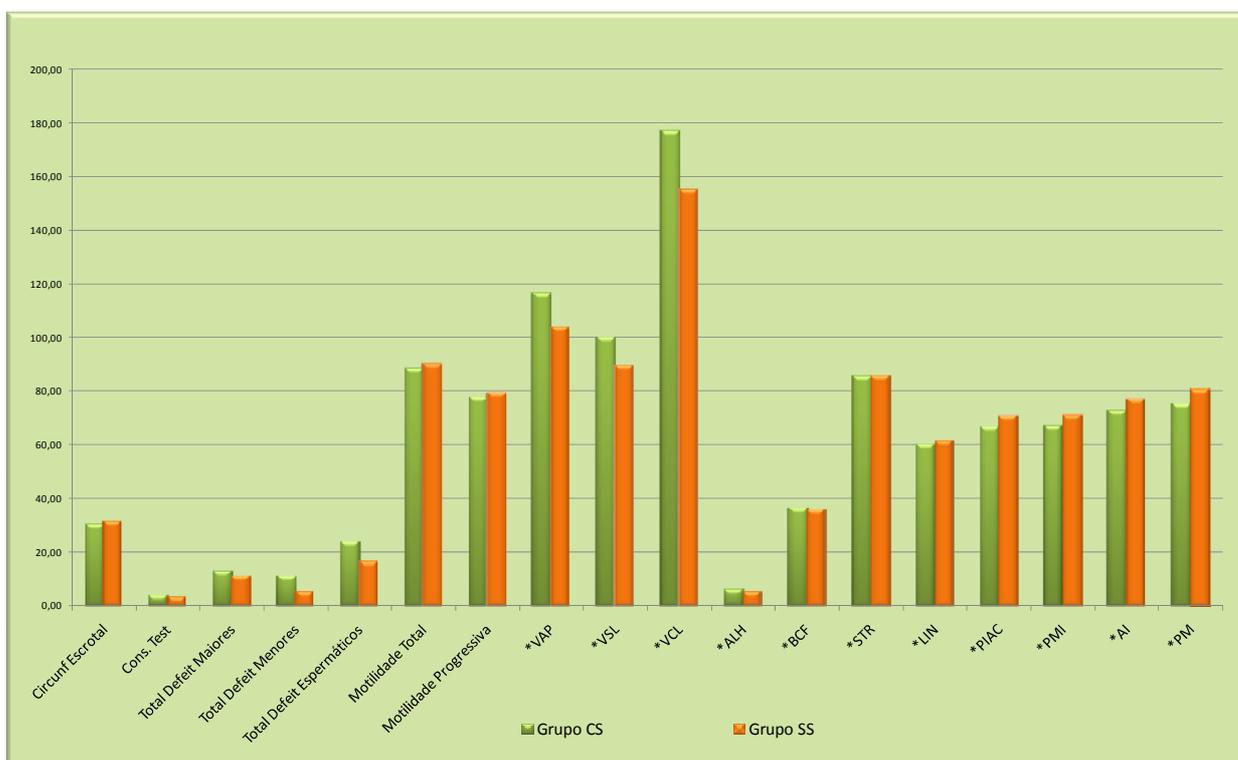


Gráfico 20 - Valores das médias (\pm erros padrão) dos espermatozoides com alto potencial mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal (PIAIC), de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

5.8.5 Resumo das Variáveis Estudadas

Os resultados de todas as variáveis estudadas durante as oito colheitas de ambos os grupos de touros, sem sombra e com sombra são apresentados no gráfico 21.



*VAP (Velocidade do trajeto); VSL (Velocidade progressiva); VCL (Velocidade curvilinear); ALH (Amplitude do deslocamento lateral da cabeça); BCF (Frequência de batimentos flagelares); STR (Retilinearidade); LIN (Linearidade); PIAC (Células com alto potencial mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal); PMI (Integridade da membrana plasmática); AI (Membrana acrossomal íntegra); PM (Alto potencial mitocondrial)

Gráfico 21 - Valores das médias das variáveis estudadas nos espermatozoides de touros da raça Nelore submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS) - Pirassununga – 2009

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Respeitar a biologia dos animais que criamos, melhorando seu bem-estar, na busca de melhores resultados econômicos, quer aumentando a eficiência do sistema de criação quer obtendo produtos de melhor qualidade ou ambos devem ser metas constantes. Neste sentido, durante estes últimos anos vem ganhando ênfases na produção, a preocupação de como o aumento da temperatura e o aquecimento global afetaria a produção animal. Nas condições de exploração brasileira de gado de corte a falta de sombra natural nas pastagens é uma realidade herdada de estabelecimentos que antes se dedicavam as atividades agrárias, como cafezais ou cultivo de cana de açúcar, em grandes áreas sem presença de árvores (GLASER, 2008).

Poucos estudos foram desenvolvidos com intuito de esclarecer o impacto que poderia ter as altas temperaturas e umidade dos trópicos em prejudicar a qualidade espermática de touros *Bos indicus indicus* e, ainda, nenhum estudo foi realizado com o objetivo de mostrar se a falta de áreas com disponibilidade de sombra afetaria ou não a espermatogênese, especialmente dos touros Nelore, raça predominante nos programas de acasalamentos de bovinos no Brasil.

Touros de qualidade seminal aceitável e atividade reprodutiva satisfatória podem diferir quanto à capacidade de regulação da temperatura testicular. Machos nessas condições, mas que não mantêm um gradiente de temperatura no parênquima testicular exibem fertilidade reduzida em relação a touros com padrões de temperatura testicular normal. Em termos práticos, a queda no desempenho de touros a campo se reveste de grande importância, visto que a taxa de reprodução é cinco vezes mais importante economicamente que a taxa de crescimento dos animais para os produtores de bovinos de corte (TRENKLE; WILLHAM, 1977; SOUZA, 2004).

A degeneração testicular leva inicialmente a flacidez e discreta diminuição do tamanho dos testículos, sendo que em etapas mais avançadas estes podem se tornar atrofiados, com tamanho reduzido, e com consistência firme a palpação (GARCIA, 2004; SOUZA, 2004).

Neste trabalho, diferentemente do que foi encontrado por Gabaldi (1999), a consistência testicular média não diferiu entre os grupos com (CS) e sem disponibilidade de sombra (SS). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Garcia (2004) que, também, não encontraram diferenças entre grupo de touros submetidos ou não à insulação testicular. No entanto, como em vários experimentos, talvez, a utilização de uma escala de pontos mais larga de 1 a 10, por exemplo, em vez de 1 a 5 ou, o uso de métodos menos subjetivos

poderiam contribuir para que os efeitos dos diversos tratamentos sobre a consistência do tecido testicular à palpação fossem mais sensivelmente detectados.

Quanto ao perímetro testicular, as médias encontradas durante o transcorrer do experimento foram de 29,8 a 31,2 cm para os touros mantidos em ambiente com acesso à sombra, e, de 30,9 a 32,2 cm, para os touros mantidos em ambiente sem acesso à sombra, de modo que não foi observado efeito estatístico para o tratamento no tempo do experimento. Esses dados são próximos aos apresentados por Gabaldi (1999), que não detectou diferença na biometria testicular entre animais controle e insulados (31,9 X 32,1 cm) e por Bonilla et al. (2004), que também não encontraram redução expressiva no perímetro escrotal de touros insulados. Sendo que, para os dois experimentos, os animais utilizados foram touros da raça Nelore com idades muito próximas as dos animais utilizados neste trabalho.

Foi propósito, neste experimento, utilizar uma técnica de avaliação das características da motilidade espermática que demonstrasse maior objetividade e imprimisse maior repetibilidade às avaliações. Neste sentido, foi utilizado de forma inédita para este tipo de experimento, o sistema computadorizado de análises da motilidade espermática, CASA, o qual permitiu avaliar a motilidade total, motilidade progressiva, velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Embora tendo sido empregado tal biotécnica, não foi possível observar nenhuma diferença estatística entre animais submetidos aos ambientes com sombra (CS) e sem sombra (SS), para todas as características estudadas.

Apesar da motilidade progressiva, avaliada neste trabalho, tenha sido por forma objetiva computadorizada e as pesquisas referentes a este assunto apresentem os dados de motilidade progressiva de forma subjetiva por microscopia óptica, cabe discussão sobre o assunto. Citando trabalho de Koivisto et al. (2008) referente aos efeitos da sazonalidade sobre a motilidade espermática, sendo observado que no verão os touros indianos apresentaram motilidade de $56,9 \pm 0,5$, enquanto no inverno $58,2 \pm 0,3\%$. Já os animais de origem européia apresentaram 51,1 e 58,5% de motilidade no verão e inverno, respectivamente. Segundo os autores foi demonstrado que os taurinos são afetados com maior severidade que os zebuínos quanto às variações climáticas anuais. Neste trabalho não foi observado efeito estatístico quanto à motilidade progressiva, onde no grupo CS, os valores das médias oscilaram de 70,6 a 82,8%, assim bem como, no grupo SS onde os valores foram de 72,1 a 83,3%. Estes valores se aproximam aos obtidos por Brito et al. (2003) (72,0%), Fernandes et al. (2008) (73,3%) e,

são superiores aos encontrados por Brito et al. (2004) (53,1%) e Dias et al. (2007) (54,8%). Estas citações foram obtidas em grupos experimentais pré-tratamento, ou grupo controle, de touros zebuínos da raça Nelore submetidos ao estresse térmico testicular.

Alterações morfológicas dos espermatozóides são consideradas de grande importância e tem relação direta com a fertilidade. Os resultados obtidos, neste estudo, para as médias de defeitos maiores foi de 10,9 a 14,9% no grupo CS e de 7,0 a 14,7% para o grupo SS. Na literatura pertinente ao assunto, observamos que Nichi et al. (2006) obtiveram valores semelhantes para defeitos espermáticos maiores com média de 10,1% no verão, assim como, Barbosa et al. (1991) encontraram valores próximos (6,5%) para touros da raça Nelore. Porém, Koivisto et al. (2008) estudando os efeitos da sazonalidade em touros taurinos e zebuínos, relatam um aumento da porcentagem de defeitos espermáticos maiores, tanto nos touros europeus de 18,1% no inverno para 43,9% no verão, por outro lado, nos touros zebuínos a média de defeitos espermáticos maiores foi de 15,7% no inverno mudando para 23,6% no verão. Os dados obtidos das anormalidades espermáticas para os dois grupos de tratamentos (CS e SS) foram muito próximos aos citados por Barbosa et al. (1991) e Nichi et al. (2006) caracterizando anormalidades espermáticas normais para touros, uma vez que se considera fora da normalidade as médias de defeitos maiores acima de 20,0%. Portanto, os animais não demonstraram alterações na espermatogênese, ao contrário do esperado, principalmente no grupo de touros que não tiveram disponibilidade de sombra.

A presença de membranas espermáticas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação, penetração nos envoltórios do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (ARRUDA et al., 2003). Neste sentido, avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies. Dessa forma, a funcionalidade ou integridade das estruturas dos espermatozóides é monitorada por sondas fluorescentes, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003; CELEGHINI et al., 2007). Baseados nestas afirmações, para os grupos experimentais deste estudo (CS e SS), foram avaliados o potencial mitocondrial e a integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides pela associação das sondas fluorescentes JC-1, PI, e FITC-PSA.

As médias das células espermáticas com integridade da membrana plasmática para o grupo de touros mantidos em ambiente sem sombra (SS) variou de 66,3 a 75,1% e, de 66,0 a 75,6% para o grupo de touros mantidos em ambiente com acesso à sombra (CS). Também

foram observados valores médios para membrana acrossomal íntegra nos touros SS de 72,5 a 84,2% e, de 68,3 a 79,0% para os touros mantidos CS. Já espermatozóides com alto potencial mitocondrial para o grupo de touros mantidos em ambiente SS foi de 69,0 a 84,6% e, de 62,1 a 83,8% para o grupo de touros mantidos CS. Mais uma vez, usando biotécnica extremamente objetiva, não foi possível observar nenhuma diferença estatística entre animais submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS), para todas as três características estudadas. No entanto, consultando publicação de Celeghini et al. (2008) (autores da metodologia utilizada neste experimento), observamos 78,1, 86,1 e 76,9% de espermatozóides com integridade da membrana plasmática, membrana acrossomal íntegra e alto potencial mitocondrial, respectivamente. Embora Celeghini et al. (2008) tenham trabalhado com sêmen de taurinos, os dados obtidos são bastante próximos aos observados neste experimento, utilizando touros da raça Nelore mantidos em ambientes com ou sem sombra.

Outro dado estudado e que apresenta bastante importância científica foi a quantidade de células espermáticas com integridade das membranas plasmáticas, acrossomais e com alto potencial de membranas mitocondriais (PIAIC), pois, espermatozóides que apresentam estes quesitos são aqueles muito próximos da viabilidade. Portanto, os resultados foram no grupo CS de 58,1 a 75,1% e para o grupo SS de 65,1 a 74,7%, não observando diferenças estatísticas para esta variável entre os dois grupos estudados. Mais uma vez notamos que os resultados obtidos neste trabalho são similares aos de Celeghini et al. (2008), estudando touros da raça taurina (72,1%) para sêmen a fresco, na população de espermatozóides com PIAIC.

A temperatura média de 24,6°C registrada no local durante o período experimental está dentro da faixa de temperatura ambiental considerada adequada para a manutenção normal da espermatogênese em bovinos, visto que a temperatura ambiental crítica para prejuízo da espermatogênese está na faixa de 27 e 32°C, segundo Skinner e Louw (1966), 26,4 a 32,2°C segundo Casady, Myers e Legates (1952) ou mais elevadas que 30°C, segundo Souza (2004).

A umidade relativa do ar média de 78,3% esteve ligeiramente acima daquela registrada por Brito et al. (2002), os quais concluíram que a umidade média entre 68,7 e 71,4% conjugada às temperaturas ambientais de 22,6 a 23,4°C não é suficiente para prejudicar a qualidade seminal de touros da raça Nelore mantidos em Centrais de Inseminação Artificial. Deste modo, apesar do experimento ter ocorrido em época com temperaturas mais quentes e maior umidade relativa do ar, o comportamento climático registrado no local (janeiro de 2007 a abril de 2008), não foi o bastante para promover diferenças estatísticas em todas as

características estudadas quando os touros foram submetidos aos ambientes com sombra (CS) ou sem sombra (SS).

Isto leva a considerar que, se o mesmo procedimento experimental fosse realizado em outra localidade, como por exemplo, na Bahia, região de Serrinha que registrou temperatura média no mesmo período da realização deste experimento de 26,7°C, sendo esta 3°C acima da média da temperatura encontrada no local desta pesquisa. Também, a região de Cuiabá no Mato Grosso, com temperatura média no mesmo período de 27,2°C (Fonte, www.inmet.gov.br), os resultados obtidos seriam os mesmos? Fica, portanto, esta resposta para investigação futura.

Em se tratando das diferenças morfofuncionais conhecidas dos touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) em relação aos taurinos (*Bos taurus taurus*), tais como: mecanismos para afrontar situações de desconforto ou estresse térmico com maior número de glândulas sudoríparas no escroto; diferenças de conformação, sendo os touros indianos mais longilíneos, apresentando grande área de superfície corporal, com isso facilitando maior perda de calor por convecção no ambiente; pele fina em sem pelos no escroto; maior diâmetro da artéria testicular, maior contato e ramificação das veias testiculares, promovendo maior superfície de troca de calor e resfriamento do sangue que penetra no parênquima testicular. Além disso, menor taxa metabólica propiciando menos produção de calor e, o que é muito importante, a cor da pele e pelos que refletem a radiação solar (BRITO et al., 2004; HANSEN et al., 2004).

Em adição ao já citado, pesquisa de Nichi et al. (2006) relata que, talvez, um mecanismo a mais de resistência térmica espermática nos *Bos taurus indicus*, seria a baixa peroxidação lipídica, resultando em reduzida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) comparado aos *Bos taurus taurus* no verão. Ainda, Lopes et al. (2003) mostram que adaptações genéticas ao calor estão presentes a nível celular em raças Bramhan e Senepol (*Bos taurus indicus*), pois, a exposição de embriões das raças Angus, Holandesa e Bramhan a 41°C por 6 horas, reduziu o desenvolvimento de blastocistos, no entanto, a raça Bramhan foi a menos afetada. Os pesquisadores também citam que os blastocistos da raça Angus não continuaram o desenvolvimento normal em 60% deles. Por outro lado, os blastocistos da raça Bramhan foram afetados em apenas 10%.

E finalmente, levando-se em consideração tais afirmações, seria o touro da raça Nelore um animal extremamente resistente ao estresse térmico? Seria este, sem dúvidas, o animal de escolha para a produção de carnes nos trópicos? O que, sem dúvidas, vem corroborar o

crescimento e a evolução genética, determinadas pelos criadores e profissionais que trabalham incessantemente com a raça.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- A disponibilidade ou não de sombra na pastagem não afeta o perímetro escrotal e a consistência testicular de touros da raça Nelore.

- A motilidade (CASA) e as características morfológicas dos espermatozoides não são afetadas quando touros da raça Nelore são mantidos em pastagens com disponibilidade ou não de sombra.

- A disponibilidade ou não de sombra na pastagem não afeta a integridade de membrana plasmática, do acrossomo e função mitocondrial nos espermatozoides de touros da raça Nelore.

REFERÊNCIA

REFERÊNCIA

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Balanço da Pecuária Bovideia de Corte. 13/12/2006, Disponível em: <www.abiec.com.br/estatisticas_relatorios.asp> Acessado em: 25 mar. 2007.
- ABLAS, D. S. **Comportamento de búfalos a pasto frente à disponibilidade de sombra e água para imersão no Sudeste do Brasil**. 2002. 70 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.
- ALBRIGHT, J. L.; ALLISTON, C. W. Effects of varying the environment upon performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, n. 32, p. 566-577, 1972.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.
- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2004.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos d diluidores e crioprotectores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescencia, citometria de fluxo, analises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2002. 121 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade de membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p 226-227, 2003. Suplemento.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Dados Estadísticos. disponível em: <www.asbia.org.br/estatisticas_relatorios.asp> Acessado em: 25/04/2008.
- AX, R. L.; GILBERT, G. R.; SHOOK, G. E. Sperm in poor quality semen from bulls during heats stress have a lower affinity for binding hydrogen-3 herin. **Journal of Dairy Science**, v. 70 n. 1, p 195-200, 1987.
- BARBOSA, R. T.; BARBOSA, P. F.; ALENCAR, M. M.; FONSECA, V. O. Biometria testicular e aspectos do sêmen de touros da raça Chanchim e Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.15, n. 3-4 , p 159-170, 1991.
- BARNETT, J. L.; HEMSWORTH, P. H. The validity of physiological and behavioural measures of animal welfare. **Applied Animal Behavior Science** v. 9, p. 177-187, 1990.
- BARTH, A. D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. *In*: **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.
- BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of te bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673-677, 1988.

- BONILLA, L.; GUIMARÃES, J. D.; SANTOS, A. Q.; BORGES, J. C.; GURZONI, W. S.; ZAMPELINI, B. **Effects of scrotal insulation on the physical and morphological characteristics of bovine semen.** In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 237
- BRITO, L. F. C., SILVA, A. E. D.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DEREGON, L. A. G.; KASTELIC, J. P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 70, p. 181-190, 2002.
- BRITO L.F.C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.
- BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOZA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511-528, 2004.
- BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar Animal : Conceito e questões relacionadas – Revisão . **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- BUNCH, D. O.; WELCH, J. E.; MAGYAR, P. L. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. **Biology Reproduction**, v. 58, p. 834-841, 1998.
- BURFENING, P. J.; ULBERG, L. C. Embryonic survival subsequent to culture to culture of rabbit spermatozoa at 38° and 40° C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 15, p. 87-92, 1968.
- CARRILLO, J. **Manejo de un rodeo de cría.** 2. ed. Buenos Aires: Inta Cerbas Eea Balcarce, 1998, 194 p.
- CASADY, R. B.; MYERS, R. M.; LEGATES, J. E. The effects of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 14-23, 1953.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using

two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

COSTA E SILVA, E.V.; RUSSI, L. S. Ambiência e reprodução de bovinos de corte. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 7., 2005, Campo Grande : UEMS, 2005. CD-ROM.

DIAS, J. C.; ANDRADE, J. V.; VALE FILHO V. R. Caracterização andrológica de touros Nelore criados extensivamente em Matto Grosso. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v 13, p. 39-46, 2007.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; DOWNING T.W.; MARSHALL, C.E. Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009-1024, 1993.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, p. 1560-1568, 2008.

GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal**. 1999. 85 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membrana, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóide de touros simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 260 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 34, p. 399-404, 1999.

GLASER, F. D. **Aspectos comportamentais de bovinos das raças Angus, Caracu e Nelore a pasto frente à disponibilidade de recursos de sombra e água para imersão**. 2008. 186 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo, São Paulo ou Pirassununga?, 2008.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55 -64, 1990.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 349-360, 2004.

HARDY, R. N. **Temperatura e vida animal**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1981.

HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; GALINA, C. S. Qualidade do semen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé frente à degeneração testicular experimental induzida por dexametazona. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, p. 523-526, 1999.

JOHNSON, W. H. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 255-270, 1997.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <www.inmet.com.br>. Acesso em: 23 mar. 2009.

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

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996.

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

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T. A.; PERRI, S. H. V.; VICENTE, W. R. R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos Taurus* Bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animal, 2009. (Published Online)**.

LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds development I temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 2003, n. 125, p. 285-294, 2003.

LUNSTRA, D.; COULTER, G. H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 767-774, 1996.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. **Molecular Reproduction Development**, v. 46, p. 408-418, 1997.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrossome reaction and degenerative acrossome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 755-763, 1992.

- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003. p. 93-104.
- NICHI, M; BOLS, P. E. J.; ZUGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in sêmen quality in *Bos indicus* and *Bos Taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.
- OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO H. F. L.; VALE, W. G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e mestiços, criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1 p. 31-35, 1988.
- PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U. Alguns aspectos a serem considerados para melhorar o bem estar de animais em sistemas de pastejo rotacionado. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 14., 1997, FEALQ: **Anais...** 1997. p.273-283.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38 p. 209-222, 1992.
- RAPHAEL, C. F. **Efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2007.
- SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Product. Scienc.** v. 67, p. 1-18, 2000.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, R. G. **Introdução a bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000.
- SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos Indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 2, p. 1784-1790, 1996.
- SOUZA, L. W. O. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos a degeneração testicular**. 2004. 183 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.
- TAO, J.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. **Molecular Reproduction Development**, v. 36, p. 183-194, 1993.
- TITTO, E. A. L. Clima: Influencia na produção de leite. In: SILVA, I. J. O. **Ambiência na produção de leite em clima quente**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 10-23.

TITTO, C. G. Tolerancia ao calor em bovinos de corte das raças européias utilizadas em cruzamentos industrial no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMETEOROLOGIA, 4., 2006 Ribeirão Preto – SP. **Anais...** Ribeirão Preto: SBBiomet, 2006. CD-ROM

TRENKLE, A.; WILLHAM, R. L. Beef production efficiency. **Science**, v. 198, n. 12, p. 1009-1011, 1977

TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction Fertility Development** v. 18, p. 25-38, 2006.

VALE FILHO, V. R.; PINTO, P. A.; FONSECA, J.; SOARES, L. C. O. V. **Patologia do sêmen: Diagnóstico andrológico e classificação de *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil – de um estudo de 1088 touros**. São Paulo: Dow Química, 1979. 54 p.

VAN CAMP, S. D. Common cause of infertility in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 2003-231, 1997.

VOGLER, C. J.; BAME, J. H.; DEJARNTTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, n. 6 p. 1207-1209, 1993

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

WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P. Effects of local heating on blood flow and metabolisms in the testis of the conscious ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 8, n. 1, p. 339-349, 1964.

WENKOFF, M. S. The evaluation of bulls for breeding soundness. Ontário: **Canadian Veterinarian Medical Association**, v. 12, p. 48, 1988.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)