

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA E BEM-ESTAR ANIMAL**

**O TEMPERAMENTO ANIMAL PODE INFLUENCIAR A QUALIDADE DO  
SÊMEN E O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE TOUROS DE CORTE?**

**Larissa de Almeida Martin**

**SÃO PAULO**  
**2022**

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA E BEM-ESTAR ANIMAL**

**O TEMPERAMENTO ANIMAL PODE INFLUENCIAR A**  
**QUALIDADE DO SÊMEN E O DESEMPENHO**  
**REPRODUTIVO DE TOUROS DE CORTE?**

**Larissa de Almeida Martin**

**Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal da Universidade Santo Amaro, UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

**SÃO PAULO**  
**2022**

M334t Martin, Larissa de Almeida

O temperamento animal pode influenciar a qualidade do sêmen e o desempenho reprodutivo de touros de corte / Larissa de Almeida Martin. – São Paulo, 2021.

51 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal) - Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho.

1. Fertilidade. 2. Nelore. 3. Sêmen. 4. Temperamento. 5. Touro.  
I. Crespilho, André Maciel, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Elaborada por Maria Lucélia S Miranda – CRB 8 / 7177

**LARISSA DE ALMEIDA MARTIN**

**O TEMPERAMENTO ANIMAL PODE INFLUENCIAR A  
QUALIDADE DO SÊMEN E O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE  
TOUROS DE CORTE?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal, da Universidade Santo Amaro, UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre junto ao Curso de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho

São Paulo \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2022

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

---

Prof. Dr. Fábio Morato Monteiro

---

Prof. Dr. Marcílio Nichi

Conceito Final: \_\_\_\_\_

*Essa Dissertação é dedicada aos meus pais, Ronaldo Bonachella Martin e Fátima Regina Tavares de Almeida Martin, ao meu noivo Filipi de Lima Gomes, ao meu sobrinho e afilhado Norberto Miguel Canela Martin e a todos que de alguma forma me incentivaram e colaboraram em mais esse projeto da minha vida!*

*Primeiramente agradeço a Deus e Nossa Senhora, que me permitiram chegar até aqui, que me iluminaram e me deram forças para não desistir.*

*Aos meus pais Ronaldo e Fátima por todo apoio, incentivo que me deram, por compreenderem minhas ausências necessárias para rodar o experimento longe de casa e escrever a dissertação.*

*Ao meu noivo Filipi, que mais uma vez estava comigo nessa nova luta, me ajudando, aguentando meus surtos, desesperos e mais uma vez não me deixando desistir.*

*Agradeço ao meu Orientador André Maciel Crespilho, por me conceder mais essa oportunidade, por acreditar que seria capaz, por todos os ensinamentos e puxões de orelha desde a graduação até aqui, pela amizade, pelas oportunidades profissionais e por ser uma grande referência para minha vida profissional!*

*Gratidão e admiração DR!!*

*Agradeço ao Dr. Fábio Morato Monteiro pelo auxílio durante todo o projeto no Instituto de Zootecnia. Ao Marcelo, Luana e Marina e toda equipe do IZ que auxiliaram e ajudaram durante o projeto.*

*Ao Professor Dr. Richardt Gama Landgraf da Unifesp pelo auxílio nas dosagens hormonais.*

*A todos que de alguma forma me incentivaram durante todo o projeto e estiveram ao meu lado.*

*E agradeço a Universidade Santo Amaro – UNISA, minha casa nesses últimos 7 anos, por ter me tornado Médica Veterinária e agora, Mestre.*

“...Para quem tenta, para quem peita, para quem vai. O preço é alto. A gente se questiona, a gente se culpa, a gente se angustia. Mas o destino, a vida e o peito às vezes pedem que a gente embarque. Alguns não vão. Mas nós, que fomos, viemos e iremos, não estamos livres do medo e de tantas fraquezas. Mas estamos para sempre livres do medo de nunca termos tentado...”

Ruth Manus

## RESUMO

O estudo teve por objetivo avaliar a influência do temperamento sobre os aspectos reprodutivos de touros Nelore, testando-se a hipótese de que a reatividade pode influenciar a capacidade de serviço, qualidade e fertilidade espermática. Para o estudo foram selecionados 16 touros da raça Nelore submetidos à análise comportamental (etograma) composta pelo escore de agitação e a avaliação da velocidade de fuga do tronco de contenção. Baseado na avaliação comportamental os reprodutores foram separados em dois grupos experimentais, poucos reativos (PR = animais calmos, n = 8) e reativos (RE = animais agitados e/ou agressivos, n= 8). Os animais foram submetidos a 2 colheitas de sangue para dosagem de testosterona e cortisol séricos; 2 amostras de sêmen também foram obtidas por eletroejaculação para realização de espermograma completo, empregando-se o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Após a análise, foram realizados 2 pools (1 por grupo) e os ejaculados foram criopreservados para realização de teste de fertilidade *in vivo* com inseminação artificial em tempo-fixo. As amostras criopreservadas foram posteriormente avaliadas quanto aos padrões cinéticos (CASA), análise morfológica e de integridade de membrana plasmática. A capacidade de monta dos animais do grupo PR e RE foi avaliada individualmente pela exposição dos touros a vacas cíclicas (n = 20 vacas/reprodutor) durante 90 dias na estação de monta natural. Os touros reativos exibiram maior escore de agitação em relação aos poucos reativos ( $P < 0,0001$ ). Não foram observadas diferenças para os parâmetros de cinética espermática, morfologia e integridade de membrana plasmática no sêmen *in natura* ou pós-descongelamento, de acordo com os diferentes perfis comportamentais. Na dosagem hormonal da rotina 2 (R2) os touros PR apresentaram menor concentração sérica de cortisol quando comparados aos animais RE (PR=  $3,46 \pm 5,81$  e RE=  $20,17 \pm 5,81$   $p= 0,0129$ ). O comportamento influenciou a taxa de concepção na monta natural, sendo observadas taxa mais elevada nos animais do grupo PR (84%) em relação aos RE (76%) ( $P < 0,0001$ ). Não foram observadas diferenças ( $P = 0,423$ ) para as taxas de concepção de vacas inseminadas com pool de sêmen de touros PR (46,15%, 24/52) em relação aos RE (42,31%, 22/52). Conclui-se que o temperamento animal não influencia a qualidade do sêmen *in natura*, pós descongelamento e integridade estrutural dos espermatozoides bovinos, justificando resultados semelhantes de concepção quando empregado sêmen de reprodutores com temperamento contrastante em programas de IATF. No entanto, touros com perfil de temperamento mais calmo apresentam melhor performance reprodutiva em programas de monta natural, característica que pode influenciar significativamente a produção de bovinos de corte.

**Palavras-chave:** Bem-estar, Bovinos, Fertilidade, Nelore, Reatividade.

## ABSTRACT

The study aimed to evaluate the influence of temperament on the reproductive aspects of Nelore bulls, testing the hypothesis that reactivity can influence service capacity, quality and sperm fertility. For the study, 16 Nelore bulls were selected and submitted to behavioral analysis (ethogram) composed of the agitation score and the evaluation of escape velocity from the containment trunk. Based on the behavioral evaluation, the breeders were separated into two experimental groups, low reactive (PR = calm animals, n = 8) and reactive (RE = agitated and/or aggressive animals, n = 8). The animals were submitted to 2 blood collections for the measurement of serum testosterone and cortisol; 2 semen samples were also obtained by electroejaculation for complete sperm analysis, using the computerized analysis system (CASA). After analysis, 2 pools were made (1 per group) and the ejaculates were cryopreserved for in vivo fertility testing with fixed-time artificial insemination. The cryopreserved samples were later evaluated for kinetic patterns (CASA), morphological analysis and plasma membrane integrity. The breeding ability of the animals in the PR and RE groups was evaluated individually by exposing the bulls to cyclic cows (n = 20 cows/reproducer) during 90 days in the breeding season. The reactive bulls exhibited a higher agitation score than the few reactive bulls ( $P < 0.0001$ ). No differences were observed for the parameters of sperm kinetics, morphology and plasma membrane integrity in in natura or post-thawed semen, according to the different behavioral profiles. In the hormone dosage of routine 2 (R2), PR bulls had lower serum cortisol concentration when compared to RE animals (PR=  $3.46 \pm 5.81$  and RE=  $20.17 \pm 5.81$  p= 0.0129). O behavior influenced the conception rate in natural mating, with a higher rate being observed in the animals of the PR group (84%) in relation to the ER (76%) ( $P < 0.0001$ ). conception rates of cows inseminated with pooled semen from PR bulls (46.15%, 24/52) in relation to RE (42.31%, 22/52). It was concluded that animal temperament does not influence semen quality in natura, after thawing and structural integrity of bovine sperm, justifying similar conception results when using semen from sires with contrasting temperament in FTAI programs. However, bulls with a calmer temperament profile present better reproductive performance in natural breeding programs, feature that can significantly influence the beef cattle production.

**Keywords:** Cattle, Fertility, Nelore, Reactivity, Wellness.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Exemplos dos animais utilizados para o estudo.....	21
<b>Figura 2</b> - Touros agrupados como reativos (RE, imagem A) e pouco reativos (PR imagem B).....	23
<b>Figura 3</b> - Microplaca (A) que compõe o kit MULTIPLEX® utilizado para leitura das concentrações séricas de cortisol e testosterona. Equipamento Magpix® (B) semelhante ao utilizado no experimento (Fonte:www.medicaexpo.com). ....	23
<b>Figura 4</b> - Equipamento CASA modelo IVOS-Ultimate® (Versão 14.0, Hamilton Thorn, Beverly, USA) utilizado para análise de cinética espermática. (Fonte: Braz, 2018). .	25
<b>Figura 5</b> - Equipamento TK 4000® empregado para refrigeração e congelação de sêmen. ....	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Referência dos parâmetros comportamentais utilizados para definir o escore de agitação (EA, notas de 4 a 16 pontos) manifestado por touros Nelore.....	22
<b>Tabela 2</b> - Média $\pm$ desvio padrão do escore de agitação (EA) e velocidade de fuga do tronco de contenção (VF; metros/segundo) avaliados para animais agrupados como pouco reativos (PR) ou reativos (RE), de acordo com as diferentes rotinas experimentais.....	29
<b>Tabela 3</b> - Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros cinéticos avaliados através da técnica computadorizada (CASA) para sêmen in natura de touros agrupados como ou reativos (RE) e pouco reativos (PR).....	30
<b>Tabela 4</b> - Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros cinéticos avaliados para o sêmen pós-descongelamento de touros agrupados como pouco reativos (PR) ou reativos (RE), independente de rotina experimental. ....	31
<b>Tabela 5</b> - Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros morfológicos do sêmen avaliados por microscopia de contraste de fase, de acordo com cada grupo experimental.....	32
<b>Tabela 6</b> - Média $\pm$ desvio padrão para a integridade de membrana plasmática avaliada pós descongelamento através da combinação de sondas fluorescentes Diacetato de 6-carboxi-fluoresceína e iodeto de propídio em microscopia de fluorescência.....	32
<b>Tabela 7</b> - Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de testosterona e cortisol avaliados mensalmente, de acordo com cada grupo experimental.....	33
<b>Tabela 8</b> - Média de taxa de concepção de fêmeas após teste de capacidade de monta de ambos os grupos experimentais.....	34

## LISTA DE SIGLAS

DCF	Diacetato de 6-carboxi-fluoresceína
EA	Escore de Agitação
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IMP	Integridade de Membrana Plasmática
IP	Iodeto de Propídio
PR	Pouco Reativos
RE	Reativos
VF	Velocidade de Fuga

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 BEM - ESTAR ANIMAL.....	13
2.2 TEMPERAMENTO ANIMAL.....	14
2.3 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SOBRE A PERFORMANCE REPRODUTIVA.....	16
2.4 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SOBRE A FERTILIDADE E A ESPERMATOGÊNESE.....	18
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
5.1 LOCAL .....	20
5.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	20
5.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	21
5.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E TESTOSTERONA .....	23
5.5 COLETA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	24
5.6 REFRIGERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN.....	25
5.7 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	26
5.9 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) .....	27
5.10 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO .....	28
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>6. RESULTADOS</b> .....	28
6.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	28
6.2 ANÁLISE DO SÊMEN <i>IN NATURA</i> .....	29
6.3 ANÁLISE DO SÊMEN PÓS DESCONGELAÇÃO.....	30
6.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SÊMEN .....	31
6.5 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA .....	32
6.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E TESTOSTERONA.....	32
6.7 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO - IATF .....	33
6.8 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO - MONTA NATURAL .....	33

<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com aproximadamente 214,7 milhões de cabeças de gado, figurando o principal exportador de carne. Com isso, a pecuária de corte nesse país, desenvolvida predominantemente de forma extensiva, é uma importante atividade econômica, capaz de gerar substancial fonte de divisas, segundo dados gerados pelo IBGE 2019.

Em virtude disso, o bem-estar animal, nos últimos anos, tem sido um tópico importante no Brasil e em outros países, pois cada vez mais a cobrança da sociedade por uma criação animal humanizada tem entrado em pauta para garantir os direitos de qualidade de vida aos animais e um abate humanitário.

Estudos têm comprovado que animais com temperamento arreadio, devido a sensibilidade ao estresse gerado por ações do manejo diário, podem desenvolver alterações comportamentais, as quais são acompanhadas por comprometimentos do sistema nervoso autônomo, neuroendócrino e adrenocorticais, podem demonstrar elevações nos níveis plasmáticos de cortisol, principal hormônio relacionado ao estresse, levando a incapacidade de manutenção da homeostase, com reflexos no desempenho produtivo e reprodutivo.

Na medicina, estudos foram desenvolvidos para correlacionar o estresse com a capacidade reprodutiva. Observou-se que indivíduos que demonstraram níveis elevados de cortisol, apresentaram uma redução na sensibilidade das gônadas ao LH, ocasionando uma supressão dos hormônios sexuais esteroides, e conseqüentemente gerando uma interferência direta na reprodução.

Nesse sentido, de acordo com o entendimento endócrino, qualquer alteração que gere interferência na secreção de testosterona poderá afetar diretamente a fisiologia reprodutiva, levando a um comprometimento na capacidade espermatogênica e, conseqüentemente, a uma diminuição da performance reprodutiva.

A influência do estresse sobre a capacidade reprodutiva já foi demonstrada, envolvendo a espécie humana como também na medicina veterinária, sobretudo relacionados a fêmeas bovinas. Até o atual momento, poucos estudos foram conduzidos para analisar a influência do estresse e temperamento sobre a capacidade

reprodutiva de touros de corte, especialmente da raça Nelore. Desse modo, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do temperamento animal sobre aspectos reprodutivos de touros, testando a hipótese de que animais mais reativos possuem pior qualidade de sêmen e menor capacidade de monta que animais menos reativo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 BEM - ESTAR ANIMAL**

O bem-estar animal é um tema que durante anos vem sendo discutido, principalmente sobre a sua influência nas práticas de produção. Dentro da sociedade, o conceito de bem-estar animal pode ser compreendido de diferentes formas, o que gera debates, sobretudo dentro da comunidade científica, sobre o impacto e aplicabilidade do tema no âmbito da produção animal. Neste contexto, Broom (2004), postulou que esse termo pode ser compreendido pela forma em que o animal se adapta ao ambiente e pelo equilíbrio entre o animal e o local onde vive.

O Brasil se destaca entre os principais líderes mundiais de produção e comercialização de carne bovina devido ao excelente desenvolvimento e estruturação do sistema de produção, desencadeado aumento na qualidade e produtividade de produtos animais (COUTO et al., 2020). Entretanto, mesmo com esse desenvolvimento é indispensável realizar ajustes em todo o ciclo produtivo, principalmente associado ao bem-estar animal, visando identificar o nível de insatisfação do animal com o ambiente, observando atitudes e alterações comportamentais e buscando aperfeiçoar o convívio entre o homem e o animal para obter-se melhorias na qualidade da carne (KELLER, 2019).

Neste mesmo contexto, autores fizeram seus estudos relacionando o bem-estar animal em bovino de leite, relacionando -o e a produção. Lopes et al. (2015), comprovaram que a produção e o bem-estar foram compensatórios em propriedades rurais com maior investimento de tecnologia para a melhoria da fazenda, onde obtiveram maior lucro e retorno. Já Hansen et al. (2019), observaram em sua pesquisa, a relação da qualidade de vida, saúde mental e situação do trabalhador ao bem-estar animal, onde observaram que a primeira interfere diretamente na segunda, gerando uma baixa produção de leite.

Práticas envolvidas na rotina de uma fazenda de bovinos de corte ou leite que são indispensáveis, como marcação dos animais, vacinações e manejo, podem causar reações e estímulos relacionados ao medo, atitudes que intensificam esses estímulos, como choques, gritos e agressões de inúmeras maneiras, podem levar ao nível elevado de estresse desses animais, com isso, devem ser abdicados das práticas de manejo (RUEDA; ARANHOS DA COSTA, 2010).

Neste contexto, em 1979 o conselho de bem-estar animal de produção criou o conceito das “Cinco Liberdades” como referência para assegurar que o animal está em situação de bem-estar: “Livre de sede, fome e má nutrição”; “Livre de desconforto”; “Livre de dor, injúria e doença”; “Livre para expressar seu comportamento natural” e “livre de medo e estresse”, porém, todos os parâmetros devem ser adotados em conjunto de forma simultânea, para que possa assegurar que os animais não estejam sofrendo nenhum dano. (DE SOUZA; GONÇALVES, 2017).

Dessa forma, segundo Ceballos e Sant’anna (2018), para obtenção de um produto de qualidade, os bovinos devem ser criados em condições naturais, em ambientes amplos, tranquilos e harmonizados, com abrigo para conforto térmico, alimentos e água disponíveis, visto que sentem emoções, sentimentos e necessidades, e que isso influencia diretamente na qualidade do produto.

Conforme Silva et al., (2018), o bem-estar influencia diretamente na produção de animais de corte, visto que é uma importante habilidade que incrementa as propriedades qualitativas do produto, também é um conjunto de normas que visam melhorar a qualidade de vida dos bovinos e garantir seus direitos.

## 2.2 TEMPERAMENTO ANIMAL

Segundo Argôlo et al. (2010), Hipócrates que é considerado “pai da medicina”, há mais de 2.000 anos descreveu o temperamento da espécie humana em quatro tipos: I) Sanguíneo, caracterizado por pessoas de humor variável; II) Melancólico, próprio de pessoas tristes e sonhadoras; III) Colérico, típico de pessoas com humor de desejo forte e sentimentos impulsivos; e IV) Fleumáticos, peculiar de pessoas lentas apáticas de sangue frio.

Neste sentido, de acordo com Volpi (2004), o psicólogo Ivan Pavlop realizou um experimento em animais onde encontrou os mesmos padrões de temperamento

humano, correlacionando com o sistema nervoso central e fatores bioquímicos. Relatou que essas características são subseqüentes de ação de processos fisiológicos e ação endócrina de alguns hormônios, podendo assim explicar a genética e interferência do ambiente sobre cada indivíduo, que são geneticamente determinados a reagir a determinados estímulos.

Ainda que com todas as diferenças comportamentais, pesquisadores acreditam que o temperamento pertence a fatores da índole onde possuem padrões de desenvolvimento ao longo da vida, podendo ser explícitos por diferentes maneiras e influenciar na docilidade ou reatividade desses reprodutores (ITO; GUZZO, 2002).

De acordo com Kasimanickam et al. (2018), observaram que receptoras de embrião com temperamento calmo e menor nível de estresse apresentaram maiores concentrações séricas de progesterona e maiores taxas de prenhez quando comparadas a vacas com temperamento excitado.

Braga et al. (2018), relataram, que o temperamento animal possui relação direta com os níveis de estresse vivenciados por bovinos de corte, sendo que rebanhos mais excitáveis possuem menor capacidade de lidar com situações estressantes, principalmente quando manejados sob condições mais restritivas.

De acordo com Rueda (2009), fatores de extrema importância para garantir o bem-estar e para a eficiência produtiva em todas as fases do ciclo pecuário, são o temperamento e o treinamento dos funcionários associados ao condicionamento dos bovinos. Interações positivas entre o homem e os animais durante o manejo de curral podem levar a redução significativa do nível de estresse, o que potencialmente pode melhorar a fertilidade (RUSSI, 2008).

A eficiência reprodutiva é uma das características mais importantes dentro de qualquer sistema de exploração pecuária. Nesse contexto, pode-se assumir que a fertilidade do touro tem maior impacto em termos produtivos e reprodutivos em relação a das vacas, visto que o macho com alto potencial de fertilidade e libido é capaz de cobrir muitas fêmeas dentro da estação reprodutiva, gerando grande número de descendentes em curto espaço de tempo (BARBOSA et al., 2005).

Situações que expõem os animais às alterações de bem-estar, tais como estímulos estressantes, doenças endócrinas, utilização de medicamentos que deprimem a espermatogênese, falhas nutricionais e alterações congênitas

afetam diretamente a capacidade de monta e a qualidade do sêmen de reprodutores (MANUJA et al., 2012; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

Em recente pesquisa voltada à avaliação do efeito do comportamento sobre o desempenho reprodutivo de touros de corte, Looockwood et al. (2018), não observaram relação entre o nível de reatividade de reprodutores Angus (calmos vs reativos/estressados) com a circunferência escrotal e qualidade do sêmen fresco. No entanto, a interação entre estresse e reatividade animal com a capacidade de termorregulação testicular, congelabilidade, fertilidade espermática, perfil de proteínas presentes no plasma seminal e capacidade de monta de bovinos não possui uma definição clara na literatura.

Levando-se em consideração que o temperamento bovino representa um tema contemporâneo e de grande interesse da indústria relacionada à produção animal (Burdick et al., 2011) e que atualmente os diferentes programas de seleção de reprodutores possuem foco voltado à docilidade e adaptabilidade ambiental visando a diminuição dos níveis de estresse animal, se justificam novos estudos nessa importante área do conhecimento.

### 2.3 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SOBRE A PERFORMANCE REPRODUTIVA

Conceitualmente o estresse representa uma reação reflexa revelada pela incapacidade de um animal em lidar com seu ambiente, o que pode levar a muitas consequências desfavoráveis que podem variar desde um leve desconforto até a morte (MANUJA et al., 2012).

Segundo Grignard et al. (2001), o temperamento pode ser considerado como reação de modo individual do animal a determinados estímulos, que normalmente estão associados ao medo, onde é considerado um fator altamente estressante. O temperamento bovino é expresso por respostas comportamentais durante o manejo, sons ou visões desconhecidas são reconhecidas como sinais de perigo (GRANDIN, 1997).

Diante disso, estudos demonstram que estímulos estressantes ao animal podem desencadear a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, elevando os níveis plasmáticos de cortisol. E caso esta situação seja verificada, a sensibilidade das gônadas ao LH pode ser reduzida (CARLSON, 2002).

De acordo com Manuja et al. (2012), ao expor os animais a situações estressantes, poderá ocorrer liberação de corticotropina (CRH) em razão de alterações no sistema nervoso central e hipotálamo. Conseqüentemente, ocorrerá a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela estimulação da CRH na hipófise, e após, estas alterações a ACTH estimulará a glândula adrenal para liberação de cortisol e catecolaminas. Com isso, as catecolaminas são responsáveis pela defesa biológica, ou seja, pela ativação do sistema nervoso autônomo, gerando respostas rápidas, de “alerta” ou “luta e fuga” do animal, levando também a um aumento da frequência cardíaca e respiratória. Portanto entende-se que a influência do estresse poderá incorrer em variações hormonais, que por sua vez, desencadearão alterações na frequência cardíaca, da pressão sanguínea e do cortisol, podendo então serem considerados como parâmetros indicadores de estresse animal (FRIEDRICH; BRAND, 2015).

Por sua vez, elevações nos níveis de cortisol afetam a liberação hipotalâmica de GnRH, liberação hipofisária de LH e FSH e, em consequência, influenciam diretamente a função gonadal pela falta de estímulo gonadotrófico para produção de hormônios esteroides (BREEN et al., 2004; MANUJA et al., 2012).

Breen et al. (2005), observaram em ovelhas ovariectomizadas que houve redução na frequência dos picos de LH pelo fato de haver elevações nas concentrações de cortisol plasmático, situação que demonstrou a importância da atuação do cortisol no hipotálamo, diminuindo a secreção pulsátil de GnRH.

Em outro estudo conduzido por Macfarlane et al. (2000), foi observado que altos níveis de cortisol reduziram a taxa de desenvolvimento folicular de ovelhas, ocorrendo retardo na liberação de estradiol pré-ovulatório e comprometimento de secreção de LH.

Braz et al. (2020), avaliaram a influência do temperamento animal sobre a capacidade produtiva e reprodutiva de touros da raça Nelore, onde concluíram que animais sob estresse, com nível de reatividade alto, apresentaram aumento dos níveis de cortisol que influenciou negativamente o ganho de peso e termorregulação testicular desses animais.

## 2.4 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SOBRE A FERTILIDADE E A ESPERMATOGÊNESE

O organismo gera respostas sob situações estressantes que levam a secreção de glicocorticoides e progesterona pelas adrenais, desencadeando então uma interferência direta na fisiologia do animal (BAGE et al., 2000; DOBSON; SMITH, 2000). Esse aumento de progesterona associado por sua vez com o aumento de cortisol, ocasiona uma interferência negativa na fertilidade gerando uma variação significativa na sincronização de ovulação (COOKE et al., 2011). Neste contexto, estudos em fêmeas bovinas demonstraram que a influência negativa gerada pelo estresse e elevação de cortisol, levaram a uma inibição do pico ovulatório de LH e uma redução da qualidade de embriões (MACEDO et al., 2011; MAZIERO et al., 2012). Também pensando nisso, Rueda et al. (2015) e Cooke et al. (2017) demonstram que essas alterações geradas pelo fator estresse, levam a diminuição nas taxas de prenhez de fêmeas bovinas submetidas a IATF.

Autores demonstraram que os altos níveis de cortisol levam também a queda de testosterona podendo comprometer a função epididimária ocasionando prejuízos na espermatogênese (BARTH; BOWMAN, 1994).

Do ponto de vista endócrino, a testosterona é o hormônio que regula a espermatogênese, a expressão dos caracteres sexuais secundários e o comportamento sexual. Por essa razão, qualquer fator que altere o perfil de secreção de testosterona compromete diretamente a capacidade espermatogênica, a libido e a performance reprodutiva (TODINI et al., 2007).

A espermatogênese pode ser afetada por diversos fatores, dentre eles a temperatura ambiental, manejo nutricional, sazonalidade, estresse, além de fator genético e racial (ARAÚJO et al., 2017). A espermatogênese ocorre nos testículos, mais precisamente nos túbulos seminíferos, onde acontece a transformação das células espermatogoniais em espermatozoides, tornando-se assim um processo complexo e susceptível a qualquer interferência (HESS; FRANÇA, 2008; HERMO et al., 2010).

Neste contexto, estudos envolvendo a espécie humana foram desenvolvidos e demonstraram que alterações neuroendócrinas relacionadas ao estresse foram capazes de exercer influência sobre a produção de testosterona pelas células de

Leydig, influenciando negativamente a espermatogênese e a qualidade espermática (HARDY et al., 2005; ZOU et al., 2019).

Segundo estudos, o estresse é capaz de influenciar na performance reprodutiva de diferentes espécies, ocasionando queda na qualidade seminal, redução de motilidade espermática e aumento de defeitos dos espermatozoides (BARTH, 1993; MIESEL et al., 1997; RETANA-MÁRQUEZ et al. 2003; HATAMOTO et al., 2006). Isso ocorre, pois o cortisol sérico pode ser transferido rapidamente para o plasma seminal ocasionando elevação nessa concentração, gerando então queda na qualidade do sêmen (GRAVES; EILER, 1979). Neste contexto, Briggs, (1973) demonstrou que espermatozoides incubados em meio contendo cortisol apresentaram redução em sua capacidade de fertilização.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Estudos anteriores, têm demonstrado que o aumento dos níveis de cortisol em seres humanos, ocasionam interferências na qualidade do sêmen (HARDY et al., 2005; JOXKOW; ROSSATO, 2017). Já na Medicina Veterinária estudos realizados em fêmeas bovinas também comprovaram que o aumento do nível de cortisol gerado pelo estresse durante a rotina de manejo, é capaz de resultar em interferências reprodutivas. (MCFARLANE et al., 2000; BREEN et al., 2005; MACEDO et al., 2011; KASIMANICKAM et al., 2018). Apesar disto, trabalhos que envolvam o temperamento, desempenho reprodutivo e qualidade do sêmen de touros ainda são escassos na literatura. Dessa forma, como a maioria dos trabalhos já realizados e publicados relacionam a baixa capacidade de serviço de touros apenas a problemas físicos e genéticos dos animais, (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; MANUJA et al., 2012), não havendo trabalhos recentes e conclusivos a respeito da influência do temperamento sobre a capacidade de serviço dos reprodutores, se justifica a realização de novas pesquisas nessa importante área do conhecimento.

### **4. OBJETIVOS**

Tendo em vista a importância econômica e biológica de touros Nelore para a produção de carne e geração de renda no campo, este estudo teve por

objetivo avaliar o efeito do temperamento animal sobre a performance reprodutiva de touros de corte, testando-se a hipótese, de que animais mais reativos possuem pior qualidade de sêmen e menor capacidade de monta que animais menos reativo.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 LOCAL**

Todos os procedimentos foram autorizados pelo comitê de ética no uso de animais da universidade Santo Amaro – UNISA, São Paulo, Brasil, pelo parecer nº 34/2020, segundo o Concelho Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O desenvolvimento ocorreu de forma multicêntrica junto ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal da UNISA, São Paulo, São Paulo, ao Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, Sertãozinho, São Paulo, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, uma propriedade pertencente à iniciativa privada localizada na cidade de Barra do Garças, Mato Grosso e a VetSêmen - Laboratório de análise de sêmen, Barueri, São Paulo.

### **5.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram selecionados 16 touros da raça Nelore nascidos e criados na mesma propriedade rural, com 24 meses ao início do experimento, hígdios, sem histórico de doenças anteriores, pesando em média 654kg e escore corporal 3 em uma escala de 1 a 9 (1 = emaciado, 9 = obeso RICHARDS et al.,1986), com circunferência escrotal em torno de 35,5cm. No início do estudo, foi realizado etograma completo, envolvendo análise de reatividade baseado no escore de agitação e velocidade de fuga do tronco de contenção (*Flight speed*), segundo metodologia adaptada de Rueda et al. (2015) e Braz et al. (2020). A partir dos resultados do etograma foram selecionados os 8 animais reativos (RE) e os 8 pouco reativos (PR).



**Figura 1** - Exemplos dos animais utilizados para o estudo.

### 5.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Para a avaliação da reatividade foram aplicados escores baseados em classificações objetivas e subjetivas. Foi analisado o grau de perturbação dos animais pela frequência e vigor com que se movimentavam dentro do tronco de contenção sendo avaliado o deslocamento, postura corporal, tensão, respiração, mugidos e coices pelo período de 2 minutos após a entrada no tronco (Tabela 1). Foi criada uma escala numérica de 1 a 4 pontos, na qual representou o grau de cada parâmetro avaliado que ao final foram somados e obtido a nota final de escore. A avaliação de reatividade foi realizada de acordo com Piovensan (1998), adaptado por Aguiar (2007) e Braz et al. (2020).

Com base nos registros das categorias comportamentais descritas foi definido o escore de agitação, que foi composto pela avaliação conjugada dos seis parâmetros comportamentais avaliados. Dessa forma, foram considerados como calmos animais que obtiveram notas de 4 a 7 e reativos àqueles com notas de 8 a 16. Adicionalmente, foi mensurada a velocidade de saída ou de fuga do tronco. Para esse teste foi

cronometrado o tempo dispendido pelo animal para percorrer 3 metros de distância a partir da abertura da porta do tronco de contenção. O princípio desse teste é de que animais naturalmente mais calmos e dóceis dispendem maior tempo para deixarem o tronco de contenção após serem liberados (SILVEIRA et al., 2006). Em ambas as análises, a pescoceira e barrigueira foram mantidas abertas para proporcionar livre mobilidade.

**Tabela 1** - Referência dos parâmetros comportamentais utilizados para definir o escore de agitação (EA, notas de 4 a 16 pontos) manifestado por touros Nelore.

Característica comportamental	Pontuação			
	1	2	3	4
Deslocamento (DESL)	Nenhum deslocamento	Pouco DESL; parado em pelo menos 50% do tempo de observação	Deslocamentos frequentes ao longo do tempo de observação	Animal se vira e/ou salta, com elevação dos membros
Postura corporal (PC)	Em estação e apoio nos 4 membros	Ajoelhado, muda o apoio para os cascos pélvicos	Deitado, apoio do ventre no solo	---
Tensão (TEN)	Relaxado, tônus muscular regular, sem movimentos bruscos, olho relaxado	Alerta, movimentos bruscos, olho arregalado, força a saída	Tenso, movimentos bruscos e vigorosos, olhos arregalados, força a saída do tronco	Muito tenso, inquietação, tremor muscular
Respiração (RESP)	Respiração normal, pouco ou não audível	Respiração facilmente audível	Animal bufando ou soprando	----
Mugidos (MUG)*	Presença	---	---	---
Coices (CC)*	Presença	---	---	---

\*Animais que não exibiram coices e mugidos no período de avaliação receberam pontuação “zero” para os parâmetros MUG e CC.

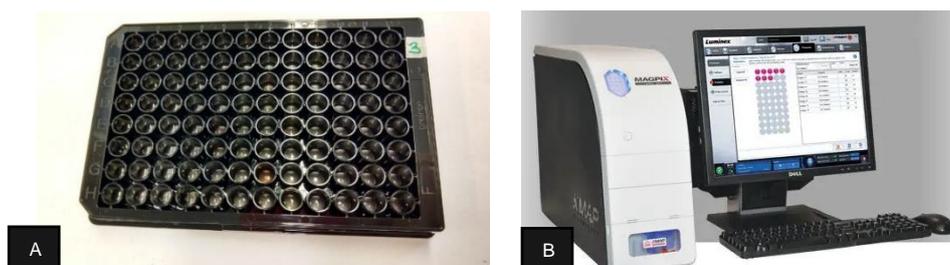


**Figura 2** - Touros agrupados como reativos (RE, imagem A) e pouco reativos (PR imagem B).

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E TESTOSTERONA

Amostras de sangue para determinação de cortisol e de testosterona foram obtidas mensalmente mediante punção da veia coccígea, utilizando sistema à vácuo com ativador de coágulo (PST, BD Vacutainer®, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). As coletas de sangue foram conduzidas durante o período matutino, respeitando-se um intervalo máximo de até 3 horas entre o primeiro e último animal. Após as coletas, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 2800 g, o sobrenadante foi recuperado em alíquota e armazenados em micro tubos de 1,5mL a -20 °C em freezer convencional até o momento das análises.

A dosagem sérica de cortisol e testosterona foram conduzidas usando kit comercial (MILLIPLEX® Multiplex for Luminex® Immunoassays, Millipore Corporation, MA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A leitura dos resultados na placa foi realizada em equipamento específico (Magpix®, Luminex, Austin, TX, EUA). Os dados foram analisados pelo software Milliplex Analyst 5.0 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). E as concentrações hormonais expressas em pg/mL.



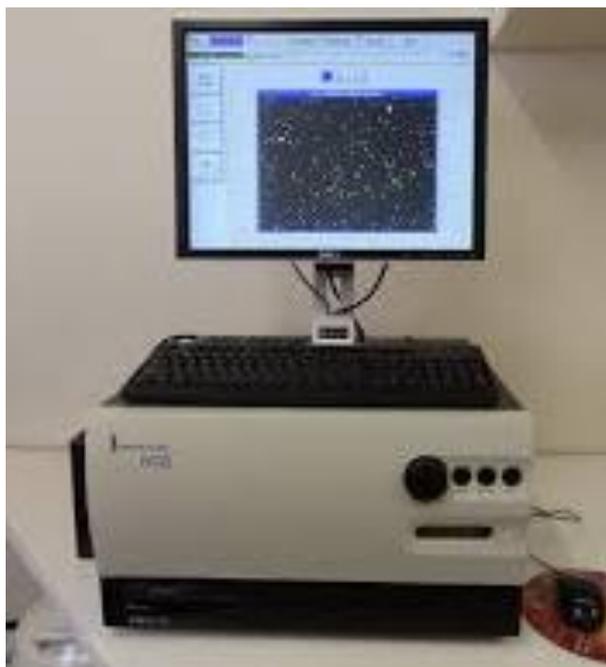
**Figura 3** - Microplaca (A) que compõe o kit MULTIPLEX® utilizado para leitura das concentrações séricas de cortisol e testosterona. Equipamento Magpix® (B) semelhante ao utilizado no experimento (Fonte:www.medicaexpo.com).

## 5.5 COLETA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

O sêmen dos animais selecionados foi colhido a cada 30 dias, durante 2 meses (n = 2 amostras de cada animal) por eletroejaculação. Os estímulos elétricos foram iniciados em baixa intensidade e progressivamente aumentados conforme programação automática do eletroejaculador (Autojac V3, Neovet®, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) em um ciclo de 1 a 32 estímulos, conforme resposta de cada touro, sendo conduzidos no máximo dois ciclos completos de estimulação/animal. Coloração, aspecto e volume do ejaculado foram analisados por observação direta do tubo graduado utilizado para a coleta.

Imediatamente após a coleta uma alíquota de cada ejaculado foi diluída em diluidor Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brasil) de forma a atender a concentração final entre 40 a 50 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL. As amostras diluídas foram submetidas a análise cinética através de sistema computadorizado (CASA, IVOS-Ultimate®, versão 14.0, Hamilton Thorn, Beverly, EUA). Nessa avaliação foram considerados os parâmetros de motilidade espermática total (MT); motilidade espermática progressiva (MP); velocidade linear (VSL); velocidade de trajeto (VAP); velocidade curvilínea (VCL); amplitude lateral de cabeça espermática (ALH); frequência de batimentos flagelares (BCF); retilinearidade (STR); linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), de acordo com o *setup* preconizado por Dias et al., (2018). A concentração espermática da amostra de sêmen foi determinada depositando 20 µL de sêmen in natura em microcubetas descartáveis, que foram lidas imediatamente em Fotômetro SDM 1 (Minitube®, Tiefencach, Germany), previamente calibrado para espécie bovina.

Adicionalmente, alíquotas de sêmen foram fixadas em solução de formol salino tamponado a 2%, para avaliação da morfologia espermática, usando microscopia de contraste de fase em aumento de 1.000X. Para essa análise foram contabilizadas 100 células e os defeitos foram classificados em maiores, menores e totais de acordo com Bloom (1973).



**Figura 4** - Equipamento CASA modelo IVOS-Ultimate® (Versão 14.0, Hamilton Thorn, Beverly, USA) utilizado para análise de cinética espermática. (Fonte: Braz, 2018).

## 5.6 REFRIGERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Para a refrigeração e criopreservação, as amostras de sêmen foram diluídas em meio comercial (BotuBov®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), respeitando-se a concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Posteriormente à diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, França) e transferidas para um refrigerador digital programável TK 4.000® (TK tecnologia em congelação, Uberaba, Brasil), seguindo uma curva de  $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $5^\circ\text{C}$ . Após estabilização a  $5^\circ\text{C}$  por quatro horas foi realizada a curva de congelação de  $-20^\circ\text{C}/\text{min}$  até atingir  $-120^\circ\text{C}$ . Quando atingiu esta temperatura, as palhetas foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ) e armazenadas até o momento de realização das análises pós-descongelação. Para análise pós descongelação, as palhetas congeladas foram descongeladas em banho-maria a  $36^\circ\text{C}$  por 30 segundos, homogenizadas em microtubos de 1,5ml e mantidas no máximo 5 minutos em banho-seco  $35^\circ\text{C}$  até as análises, realizadas também pelo CASA e obtidos os mesmos parâmetros na avaliação do sêmen *in natura*.



**Figura 5** - Equipamento TK 4000® empregado para refrigeração e congelação de sêmen.

## 5.7 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para a análise de integridade de membrana plasmática pós-descongelação foi utilizada a associação de diacetato de 6-carboxi-fluoresceína e iodeto de propídio. Para esse protocolo alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram previamente separadas e acrescidas de 25  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato salina, 50  $\mu\text{L}$  da solução sonda já preparada com 1 mL de PBS, 30  $\mu\text{L}$  da solução estoque de diacetato de 6-carboxi-fluoresceína, 120  $\mu\text{L}$  da solução estoque de iodeto de propídio e 20  $\mu\text{L}$  de formol salino, de acordo com metodologia adaptada de Crespilho et al. (2012). A amostra foi incubada por 5 minutos à 37 °C ao abrigo da luz. Posteriormente foi realizada preparação úmida para análise em microscopia de fluorescência em um aumento de 1.000X. O Iodeto de Propídeo emiti uma cor vermelha, de 617 nm. Nessa avaliação foram contabilizadas 100 células espermáticas e identificadas em 2 subpopulações, aquelas portadoras de membrana plasmática lesada e íntegra (HOLT; NORTH, 1994; GILLAN et al., 2005).

## 5.8 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO E DESEMPENHO SEXUAL

Todos os 16 touros inicialmente selecionados foram elegíveis para o teste de comportamento e desempenho sexual. Para esta etapa os animais foram separados do lote de manejo e alojados individualmente em piquetes de 60000 m<sup>2</sup> formados por *Brachiaria decumbens* na presença de 20 vacas Nelore com média de escore corporal 2 em uma escala de 1 a 9 (1 = emaciada, 9 = obesa, de acordo com Richards et al., 1986), multíparas, pelo período de 90 dias.

Ao final do período de monta os reprodutores foram separados dos lotes de fêmeas e foi realizado o diagnóstico de gestação.

### 5.9 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

Baseado nos resultados do etograma e da velocidade de fuga, para essa etapa experimental foram selecionados os 3 touros reativos e os 3 touros pouco reativos para novas coletas de sêmen. Os ejaculados obtidos foram misturados em sua totalidade no ato da coleta para a formação de pool de sêmen dos animais do grupo reativo e outro do grupo pouco reativo, criando o contraste necessário para investigação das possíveis interações entre comportamento e fertilidade animal. O pool de sêmen de cada grupo experimental foi criopreservado utilizando a mesma metodologia apresentada no tópico 4.6 e as amostras armazenadas para inseminação artificial.

Para as IATF foram selecionadas 104 vacas Nelore, multíparas, não-lactantes sendo divididas em dois grupos iguais para serem inseminadas de forma aleatória com pool de sêmen de cada grupo, durante a estação de monta (2020/2021).

No primeiro dia do protocolo de IATF todas as vacas foram avaliadas quanto a condição corporal utilizando escala de 1 a 5 (1 = emaciada, 5 = obesa, de acordo com Ayres et al., 2009), onde tiveram em média escore corporal 2,75. Todos os protocolos de IATF foram realizados durante os meses de dezembro a fevereiro na mesma propriedade rural.

O protocolo de sincronização do estro consistiu nas recomendações da OuroFino Saúde Animal (Cravinhos, São Paulo, Brazil) para gado de corte. Com ele, as fêmeas receberam implante de progesterona no D0 junto com aplicação de 2mg de Sincrodiol® (benzoato de estradiol); após 8 dias (D8) receberam aplicação de 0,52mg de Sincrocio® (cloprostenol sódico), 1mg de SincroCP® (cipionato de

estradiol), 500 UI de Sincro eCG® e retirado o implante de progesterona. Após 54 horas foi realizada a IATF em todas as fêmeas.

## 5.10 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

As vacas submetidas ao teste de capacidade de serviço e à IATF foram avaliadas pelo exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação. As avaliações ultrassonográficas foram conduzidas a partir de 30 dias após o término dos trabalhos de inseminação e/ou do período de monta dos touros selecionados. A detecção de vesícula embrionária com embrião viável (presença de batimentos cardíacos) foi utilizada como indicativo de gestação.

## 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito do estresse sobre a performance reprodutiva de touros foi avaliado pelo modelo linear de análise de variância utilizando medidas repetidas no tempo (PROC MIXED-SAS, SAS Institut Inc, Cary, EUA). Cada variável foi testada quanto à normalidade e homogeneidade e as variáveis que não se enquadraram nesse critério foram transformadas em log previamente à análise estatística. Adicionalmente, o resultado das avaliações comportamentais (etograma e velocidade de fuga do tronco de contenção) foi considerado como variável independente em um modelo linear, testando-se o grau de dependência de cada variável reprodutiva estudada com os diferentes padrões comportamentais manifestos pelos touros.

A taxa de concepção na IATF e após o teste de monta natural foram avaliadas pelo modelo linear de análise de variância (PROC GLIMMIX, SAS), sendo a taxa de concepção considerada como variável dependente e o escore de condição corporal das vacas, velocidade de fuga do tronco de contenção, grau de reatividade animal e suas possíveis interações como variáveis independentes. Diferenças estatísticas foram consideradas quando de  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Quando comparados os grupos, de forma independente ao momento experimental, foram observadas diferenças para o escore de agitação  $8,60 \pm 0,34$  e PR  $4,50 \pm 0,38$ , respectivamente para animais RE e PR;  $P < 0,0001$ . Quando comparados dentro de cada rotina experimental, animais reativos também apresentaram maior escore de agitação, de acordo com a tabela 2 abaixo.

Quando comparados os diferentes grupos, independentemente da rotina experimental não foram observadas diferenças para velocidade de fuga  $3,02 \pm 0,64$  e  $2,05 \pm 0,46$ , respectivamente para animais RE e PR ( $P = 0,2450$ ) e avaliados dentro das respectivas rotinas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Média  $\pm$  desvio padrão do escore de agitação (EA) e velocidade de fuga do tronco de contenção (VF; metros/segundo) avaliados para animais agrupados como reativos (RE) ou pouco reativos (PR), de acordo com as diferentes rotinas experimentais.

ROTINAS	PARAMETROS	PR	DP	RE	DP	P <0,05
1	EA	4,75	0,64	10,40	0,57	0,0003
	VF	2,34	0,84	1,26	0,68	0,3435
2	EA	4,25	0,64	6,80	0,57	0,0219
	VF	3,71	1,03	2,84	0,68	0,4976

EA escore de agitação, VF velocidade de fuga.

## 6.2 ANÁLISE DO SÊMEN *IN NATURA*

Todas as amostras de sêmen colhidas se apresentaram dentro dos padrões mínimos de qualidades estabelecidos para o sêmen bovino, conforme parâmetros e valores de referência preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Não foram observados efeitos das diferentes rotinas, assim como do temperamento animal sobre os parâmetros de cinética espermática avaliados para o sêmen *in natura*, de acordo com cada grupo experimental (Tabela 3).

**Tabela 3** - Média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros cinéticos avaliados através da técnica computadorizada (CASA) para sêmen in natura de touros agrupados como ou reativos (RE) e pouco reativos (PR).

PARAMETROS CASA	GRUPOS			VALOR DE P
	PR	RE	DP	
MT (%)	90,62	75,70	12,55	0,2732
MP (%)	68,25	55,40	10,14	0,2457
VAP ( $\mu\text{m/S}$ )	100,91	106,53	13,97	0,6997
VSL ( $\mu\text{m/S}$ )	80,93	84,16	8,6367	0,7201
VCL ( $\mu\text{m/S}$ )	168,65	184,47	28,68	0,5984
ALH ( $\mu\text{m}$ )	6,27	7,36	1,02	0,3230
BCF ( $\mu\text{m}$ )	31,70	28,60	2,48	0,2519
STR (%)	81,65	80,80	3,47	0,8192
LIN (%)	51,62	49,60	4,01	0,6296
RAP (%)	87,75	72,50	12,98	0,2785

DP desvio padrão, MT (motilidade total; %), MP (motilidade progressiva; %), VAP (velocidade do trajeto;  $\mu\text{m/s}$ ), VSL (velocidade retilinear;  $\mu\text{m/s}$ ) VCL (velocidade curvilinear;  $\mu\text{m/s}$ ), ALH (amplitude lateral de cabeça espermática;  $\mu\text{m}$ ), BCF (frequência de batimentos flagelares; Hz), STR (retilinearidade; %), LIN (linearidade, %) e RAP (espermatozoides com movimento rápido).

### 6.3 ANÁLISE DO SÊMEN PÓS DESCONGELAÇÃO

Não foi observado efeito dos diferentes grupos sobre nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados para o sêmen pós-descongelamento. Da mesma forma, não foram observadas interações entre as diferentes rotinas experimentais e as diferentes variáveis cinéticas pesquisadas (Tabela 4).

**Tabela 4** - Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros cinéticos avaliados para o sêmen pós-descongelamento de touros agrupados como reativos (RE) ou pouco reativos (PR), independente de rotina experimental.

PARAMETROS CASA	GRUPOS			VALOR DE P
	PR	RE	DP	
<b>MT (%)</b>	37,81	28,16	6,86	0,2028
<b>MP (%)</b>	20,23	15,04	3,29	0,1590
<b>VAP (µm/S)</b>	52,46	48,82	2,56	0,1989
<b>VSL (µm/S)</b>	38,18	36,21	2,15	0,3893
<b>VCL (µm/S)</b>	84,17	81,53	5,20	0,6270
<b>ALH (µm)</b>	3,45	3,38	0,25	0,7877
<b>BCF (µm)</b>	9,07	9,88	0,47	0,1373
<b>STR (%)</b>	72,26	74,26	2,72	0,4875
<b>LIN (%)</b>	44,88	44,40	2,79	0,8665
<b>RAP (%)</b>	22,95	15,31	3,97	0,0961

DP desvio padrão, MT (motilidade total; %), MP (motilidade progressiva; %), VAP (velocidade do trajeto; µm/s), VSL (velocidade retilinear; µm/s) VCL (velocidade curvilinear; µm/s), ALH (amplitude lateral de cabeça espermática; µm), BCF (frequência de batimentos flagelares; Hz), STR (retilinearidade; %), LIN (linearidade, %) e RAP (espermatozoides com movimento rápido).

#### 6.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SÊMEN

Não foram observadas diferenças para a quantificação de defeitos morfológicos quando comparados os grupos de temperamento contrastante (Tabela 5).

**Tabela 5** - Média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros morfológicos do sêmen avaliados por microscopia de contraste de fase, de acordo com cada grupo experimental.

ROTINAS	PARAMETROS	PR	DP	RE	DP	VALOR DE P
1	Def. Maiores	6,00	3,47	9,60	3,10	0,4687
	Def. Menores	8,00	3,37	8,80	3,01	0,8655
	Def. Totais	14,00	5,16	18,40	4,61	0,5486
2	Def. Maiores	15,59	4,00	17,20	3,10	0,7624
	Def. Menores	12,65	3,77	11,00	3,01	0,7434
	Def. Totais	28,98	5,53	28,20	4,61	0,9168

Onde: PR, pouco reativos; RE, Reativos; DP Desvio padrão

## 6.5 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Não foram observadas diferenças para a análise estrutural de integridade de membrana plasmática, quando comparados os diferentes grupos analisados independente de rotina ( $18,5 \pm 2,92$  e  $23,62 \pm 3,26$  respectivamente para animais RE e PR;  $P = 0,2804$ ). Da mesma forma, não foram observadas influência dentro de cada rotina experimental, conforme resultados na tabela 6.

**Tabela 6** - Média  $\pm$  desvio padrão para a integridade de membrana plasmática avaliada pós descongelação através da combinação de sondas fluorescentes Diacetato de 6-carboxi-fluoresceína e iodeto de propídio em microscopia de fluorescência.

ROTINAS	PR	DP	RE	DP	P <0,05
1	24,62	4,16	20,30	3,72	0,4641
2	22,62	4,16	16,70	3,72	0,3240

DP Desvio padrão.

## 6.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E TESTOSTERONA

A quantificação de cortisol e testosterona não demonstram diferenças quando comparados os grupos de forma independente de rotina (Cortisol: RE= 10,90 pg/ml e

PR= 10,57 pg/ml P= 0,8160 e Testosterona: RE= 8,16 pg/ml e PR= 21,86 pg/ml DP= 5,37 P= 0,1449), no entanto, quando comparado os respectivos grupos dentro de cada rotina, houve tendência a aumento de cortisol nos RE na primeira rotina e um aumento na segunda rotina conforme tabela 7.

**Tabela 7** - Média  $\pm$  desvio padrão dos níveis séricos de testosterona e cortisol avaliados mensalmente, de acordo com cada grupo experimental.

ROTINAS	PARAMETROS	PR	RE	DP	P <0,05
1	CORTISOL	6,08	14,40	4,50	0,1471
	TESTOSTERONA	7,28	9,66	4,89	0,1318
2	CORTISOL	3,46	20,17	5,81	0,0129
	TESTOSTERONA	11,25	4,91	6,31	0,327

DP Desvio padrão.

## 6.7 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO - IATF

Não foi observado efeito dos diferentes temperamentos analisados para o teste de fertilidade realizado em fêmeas submetidas a IATF com o pool de sêmen dos respectivos grupos. Dessa forma, os dois lotes de 52 fêmeas inseminadas obtiveram uma taxa de 46,15% e 42,31% respectivamente para os grupos Reativos e Pouco Reativos (P= 0,4218).

## 6.8 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO - MONTA NATURAL

Após Inspeção visual conduzida durante a fase inicial de separação dos lotes foi excluído um dos animais do grupo RE que manifestou claudicação.

Após 90 dias de estação de monta foi observado que fêmeas acasaladas com touros pouco reativos apresentaram em média 84% de taxa de concepção, e as fêmeas acasaladas com os touros reativos 76% de prenhez (P = 0,0001).

**Tabela 8** - Média de taxa de concepção de fêmeas após teste de capacidade de monta de ambos os grupos experimentais.

<b>GRUPO</b>	<b>Vacas (n=)</b>	<b>Prenhez (n=)</b>	<b>Taxa de Concepção (%)</b>
<b>PR</b>	160	122	84%
<b>RE</b>	138	109	76%

## **7. DISCUSSÃO**

A maioria dos estudos publicados anteriormente avaliaram a influência do estresse sobre a performance reprodutiva de fêmeas bovinas voltadas ao corte (COOKE et al., 2017; COOKE et al., 2018) e produção de leite (KASIMANICKAM et al., 2014) ou apenas, a influência de problemas físicos e genéticos dos touros sobre a performance reprodutiva (MANUJA et al., 2012; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015), havendo poucos trabalhos publicados até o momento sobre as possíveis interações da reatividade animal sobre o desempenho reprodutivo de bovinos de corte.

Em nosso estudo, foi observado que o comportamento animal classificado no início do experimento se manteve ao longo das duas rotinas, não sendo observados touros com temperamento incompatível com o agrupamento inicialmente realizado.

De acordo com os resultados comportamentais, foi observado que touros reativos apresentaram maiores valores de cortisol quando comparados com os touros pouco reativos dentro de cada rotina experimental ( $P= 0,0129$ ). Resultados similares também foram reportados por Braz et al. (2020), que observaram que touros reativos da raça Nelore possuem maiores níveis de cortisol plasmático quando comparados a animais pouco reativos. Estudos demonstram que bovinos de temperamento mais reativo apresentam ativação mais intensa e prolongada do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (COOKE et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2014), gerando aumento da produção de corticotropina (CRH) (FRIEDRICH; BRAND, 2015).

Conseqüentemente, com a secreção de CRH, ocorre a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela estimulação na hipófise, e após, estas alterações endócrinas, a ACTH resulta no estímulo a glândula adrenal para liberação de cortisol e catecolaminas, gerando então respostas de luta e fuga (MORRELL, 2020).

Em bovinos excitáveis a concentração de cortisol na circulação pode ser desencadeada por uma resposta aguda a contenção e manipulação, já que na espécie essa elevação ocorre em poucos minutos após o insulto (HOPSTER et al., 1999. CURLEY et al., 2006). Segundo Cunnigham (2004), a resposta do indivíduo ao agente estressor é imediata e proporcional a magnitude desse agente, desse modo na segunda rotina do experimento, situações estressantes relacionadas ao manejo podem ter desencadeado uma resposta aguda e momentânea, elevando os níveis de cortisol, uma vez que, na primeira rotina não houve diferença entre os grupos analisados, podendo explicar a diferença encontrada dentro de cada rotina experimental em nosso trabalho.

A espermatogênese, a expressão dos caracteres sexuais secundários e o comportamento sexual são regulados pelos níveis de testosterona endógena; por essa razão qualquer fator que altere o perfil de secreção desse hormônio pode comprometer diretamente a capacidade espermatogênica, a libido e a performance reprodutiva (TODINI et al., 2007).

Diante disso, no aspecto reprodutivo de machos, o aumento de cortisol pode ocasionar uma queda na produção de testosterona, podendo comprometer a função epididimária gerando prejuízos na espermatogênese (BARTH; BOWMAN, 1994). É importante considerar que agentes estressores de curta duração (estresse agudo) geralmente não afetam a função reprodutiva (MOBERG, 1991). Exposto isso, as elevações nos níveis de cortisol do presente estudo e o tempo a exposição ao nível sérico, podem não ter sido suficientes para gerar interferências na produção hormonal e a espermatogênese.

Neste contexto, a queda no desempenho reprodutivo tem sido associada ao nível elevado de cortisol, gerando interferência na espermatogênese em diferentes espécies. Hardy et al. (2005) observaram que homens sob estresse, vivenciando ambiente de elevação dos níveis de cortisol, dietas calóricas, excesso de gordura corporal, entre outros fatores, apresentaram queda nas concentrações séricas de testosterona, com conseqüente prejuízo à espermatogênese e a qualidade do sêmen.

Estudos envolvendo a espécie humana também demonstraram que alterações neuroendócrinas relacionadas ao estresse foram capazes de exercer influência sobre a produção de testosterona pelas células de Leydig, influenciando negativamente a espermatogênese e a qualidade espermática (HARDY et al., 2005; ZOU et al., 2019).

Diante disso, Looockwood et al. (2017), não observaram relação entre o nível de reatividade de reprodutores Angus (calmos vs reativos/estressados) com a qualidade do sêmen e circunferência escrotal. Animais mais reativos, tiveram em torno de 8 ng/mL, uma vez que, estudos indicam que a concentração basal de cortisol para touros *bos taurus* é de 15 ng/mL (CHASE et al., 1995). Em nosso estudo, a concentração de cortisol circulante teve um aumento pequeno, quando comparada com valores para concentração basal descritos por autores para a espécie bovina 5 e 10 ng/mL (YOSHIDA et al., 2005). Em relação a reatividade (reativos = 10,90 pg/mL; pouco reativos 10,57 pg/mL - P= 0,8160), sugere-se que os resultados obtidos não foram suficientes para ocasionar a redução das concentrações séricas de testosterona, o que poderia gerar um comprometimento da qualidade do sêmen dos grupos analisados.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), para um protocolo de criopreservação, espera-se que haja pelo menos 50% de espermatozoides vivos após todo processamento. A técnica de criopreservação espermática pode levar a uma redução na qualidade do sêmen desses reprodutores (WATSON, 2000). No entanto, resultados pós descongelamento de motilidade total e progressiva em média se apresentaram abaixo dos valores mínimos preconizados pelo CBRA, podendo ser explicado por uma falta de seleção prévia dos bovinos para fins de criopreservação.

A membrana espermática possui funções ativas no processo de fertilização como a capacitação, reação acrossômica, hiperativação da motilidade e interação com a membrana plasmática do oócito. A criopreservação pode gerar alterações semelhantes à capacitação no espermatozoide bovino, desestabilizando a membrana plasmática e tornando-a mais sensível (GADELLA et al., 2001). Uma elevada prevalência de defeitos oriundos da espermatogênese indica falhas nesse processo, podendo acarretar o desenvolvimento anormal da estrutura das membranas espermáticas, tornando-as mais sensíveis, promovendo, assim, menor tempo para capacitação (BLOM; BIRCH-ANDERSON, 1962). Segundo Watson (1995), a criopreservação provoca estresse químico, osmótico, térmico e mecânico, sendo que eles são originados, principalmente, nas fases de resfriamento e descongelamento do sêmen, conduzindo à perda de em torno 50 % na viabilidade espermática. Sabe-se que os efeitos da criopreservação e posterior descongelamento promove alterações

na estrutura e na integridade da membrana plasmática (CELEGHINI, 2005; DIAS et al., 2018). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura. Possivelmente, isso ocorreu pelos níveis de cortisol não terem sido suficientes para gerar interferência na espermatogênese. Braz e colaboradores (2020), apresentaram resultados semelhantes ao observado, indicando que a reatividade animal não gera influência sobre as características estruturais das células espermáticas.

Segundo Crespilho et al. (2009), um dos métodos que possuem maior sensibilidade para a avaliação do potencial de fertilização do sêmen é a Inseminação Artificial. Estudos anteriores (COOKE et al., 2011; RUEDA et al. 2015 e COOKE et al. 2017), demonstram a influência da reatividade animal nas taxas de prenhez após a IATF, fêmeas mais reativas possuem altos níveis de progesterona liberada pela adrenal (gerados pelo aumento de secreção de cortisol), ocasionando uma inibição ao pico ovulatório de LH.

Diante do exposto, é possível justificar a ausência, da interferência da reatividade animal sobre a fertilidade dos touros dos respectivos grupos analisados. A partir disso, sugere-se que houve uma influência na fertilidade das fêmeas submetidas ao protocolo de IATF decorrente ao manejo nutricional e ao escore de condição corporal médio do rebanho (ECC = 2,75). Apesar da fertilidade das fêmeas a utilização do pool pode ter influenciado as taxas de IATF, pois as análises pós descongelamento das partidas utilizadas na composição do pool não corresponderam aos parâmetros cinéticos mínimos pré estabelecidos pelo CBRA, onde o pool RE teve média de MP de 22% e MT 34% e o pool PR MP19% e MT 27%.

Na avaliação do desempenho reprodutivo dos touros, foi observado que as fêmeas acasaladas com animais do grupo RE apresentaram menores taxas de concepção em relação àquelas acasaladas com touros agrupados como PR, gerando uma diferença de 8% entre os grupos. Na literatura, é descrito o efeito do estresse, principalmente o estresse térmico, como interferência na performance reprodutiva, onde gera um aumento na frequência respiratória e um aumento na alcalose, a qual provoca alterações na temperatura média do parênquima, provocando hipóxia no tecido testicular e epididimário, gerado pelo distúrbio do fluxo sanguíneo, aumento da atividade metabólica e diminuição do oxigênio (MORELL, 2020).

Neste contexto, segundo Braz, et al. 2020 em seu estudo com bovinos de corte, foi possível observar que animais mais reativos possuíam níveis de cortisol mais

elevados quando comparados com animais calmos, e cerca de elevação de 1°C em polo caudal testicular, ocasionando então interferências na termorregulação. Tal injúria, pode gerar interferências comportamentais, como redução de libido e na qualidade do plasma seminal, ocasionando implicações diretas na fertilidade espermática (VIEIRA-NETO et al., 2019).

Estudos anteriores demonstram que a reatividade animal também pode ser um fator prejudicial na performance reprodutiva, animais mais reativos possuem maior agressividade e por sua vez, dispendem maior gasto de energia para se manter alerta a qualquer estímulo (ALCOCK, 2011; BRAGA et al., 2018). Contudo, podemos dizer que o gasto de energia ocasiona prejuízos na capacidade de serviço, já que animais calmos não demandando do mesmo gasto, onde possuem maior energia para realização da monta e por sua vez maior libido, acasalando com maior número de fêmeas. Tal comportamento poderia então explicar os resultados obtidos neste estudo, onde vimos que os calmos conseguiram acasalar com maior número de fêmeas.

Contudo, embora se reconheça que o estresse associado ao temperamento animal possa influenciar a libido, de acordo com Petherick (2005) ainda são escassos os estudos voltados a esse e outros temas importantes que envolvem a relação entre comportamento animal e desempenho reprodutivo do macho, dificultando ainda mais a construção de uma compreensão geral desse fenômeno e enfatizando a necessidade de mais estudos a respeito da influência do temperamento sobre a performance reprodutiva de touros.

## **8. CONCLUSÃO**

Touros com perfil de temperamento mais calmo apresentam menores níveis séricos de cortisol e melhor performance reprodutiva em programas de monta natural, característica que pode influenciar significativamente a produção de bovinos de corte. No entanto, temperamento animal não influencia a qualidade do sêmen *in natura*, pós descongelação e integridade estrutural dos espermatozoides bovinos, justificando resultados semelhantes de concepção quando empregado sêmen de reprodutores com temperamento contrastante em programas de IATF.

## REFERÊNCIAS

- ALCOCK, J. Comportamento animal: Uma abordagem evolutiva. Artmed: Porto Alegre, 2011. p. 172-180.
- AGUIAR, N. M. A. Avaliação da reatividade de bovinos de corte e sua relação com caracteres reprodutivos e produtivos. Dissertação (Mestrado) – UNESP - Jaboticabal, São Paulo 2007. 69p.
- ARAÚJO, E.A.B.; SILVA, L.F.M.C.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI, F.M.; ANDRADE Jr., L.R.P.; SOUZA, F.F.; DELL'AQUA Jr., J.A.; PAPA, F.O. Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. Veterinária e Zootecnia, v. 24, n. 1, p.70-83, 2017.
- ARGÔLO, L. S.; BARROS, M. C. C.; MARQUES, J. A.; TEODORO, S. M.; PEREIRA, M. L. A. Comportamento e temperamento em ruminantes. PUBVET, Londrina, V. 4, N. 13, ed. 118, Art. 795, 2010.
- AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; DEMÉTRIO, C.G.B.; DE LIMA, C.G.; BARUSELLI, P.S.; Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nellore (*Bos indicus*) cows. Livestock Science, v.123, p.175-179, 2009.
- BAGE, R.; FORSBERG, M.; GUSTAFSSON, H.; LARSSON, B. Effects of ACTH-challenge on progesterone and cortisol levels in ovariectomized repeat breeder heifers. Anim. Reprod. Sci., v.63, p.65-76, 2000
- BARBOSA, R.T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; A importância do exame andrológico em bovinos. Circular Técnica Embrapa, v.41, p.65, 2005.
- BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. Canadian Veterinary Journal, v. 35, p. 93-102, 1994.
- BLOM, E.; BIRCH-ANDERSON, A. Ultrastructure of sterilizing knobbed acrosome defect in the bull. Nature, v.194, p.989-990, 1962.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. Nord Veterinary Medicine, v. 25, p. 383-339, 1973.
- BRAGA, J. S.; FAUCITANO, F.; MACITELLIA, F.; SANT'ANNA, A. C.; MÉTHOT, S.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Temperament effects on performance and adaptability of Nellore young bulls to the feedlot environment. Livestock Science, v.216, p.88–93, 2018.
- BRAZ, K. M. G.; MONTEIRO, F. M.; FERNANDES L. G.; RODRIGUES, N. N.; PEIXOTO JR, K. C.; GREN, R. E.; CORTEZ, A.; CRESPILO, A. M. Does bull temperament impact growth performance and semen quality? Livestock Science 236 2020.

BREEN, K.M.; WAGENMAKER, E.R.; WESSINGER E.W.; KARSCH, F.J. Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology*, v.156, p.2107-2115, 2005.

BREEN, K.M.; KARSCH, F.J. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? *Endocrinology*, v.145, p. 692-698, 2004.

BRIGGS, M. H. Steroid hormones and the fertilizing capacity of spermatozoa. *Steroids*, v. 22, p. 547-553, 1973.

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. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/4057/3287>.

BURDICK, N.C.; CARROLL, J.A.; RANDEL, R.D.; WILLARD, S.T.; VANN, R.C.; CHASE Jr, C.C.; LAWHON, S.D.; HULBERT, L.E.; WELSH Jr., T.H. Influence of temperament and transportation on physiological and endocrinological parameters in bulls. *Livestock Science*, v.139, p.213–221, 2011.

BUTLER, M. L.; BORMANN, J. M.; WEABER, R. L.; GRIEGER, D.M., ROLFSELECTION, M. M. Selection for bull fertility: a review. *Translate basic science to industry innovation*, P. 423-441, 2020. Downloaded from <https://academic.oup.com/tas/article/4/1/423/5650402> by guest on 03 January 2022

CARLI, Maria Eduarda de Souza. Reatividade e estresse em garrotes cruzados Angus Nelore em confinamento. 2018, 48 F. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

CARLSON, N.R. *Fisiologia do comportamento*. 7ed. Barueri, SP: Manole, 2002. 699p.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CEBALLOS, M.; SANT'ANNA, A. Evolução da ciência do bem-estar animal: Uma breve revisão sobre aspectos conceituais e metodológicos. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, [S.l.], v. 16, p. 1 - 24, ago. 2018. ISSN 2596-2868. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/23740>.

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. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, v. 104, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI E. C. C.; ARRUDA, R. P.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; DOS SANTOS, F. B.; ALVES, M. B. R.; DE OLIVEIRA, B. M. M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, 2017. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

CHASE C.C.; LARSEN R.E.; RANDEL R.D.; HAMMOND A.C.; ADAMS E.L. Plasma cortisol and white blood cell responses in different breeds of bulls: a comparison of two methods of castration. *Animal Science*1995;73: 975–80.

CHIQUITELLI NETO, M. et al. Efeito do intervalo de tempo entre os dias de manejos sobre a reatividade em bovinos de corte. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 16, p. 1-9, 2011.

COOKE, R.F.; BOHNERT, D.W.; MENEGHETTI, M. et al. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed-timed AI in *Bos indicus* beef cows. *LivesScience.*, v.142, p.108-113, 2011.

COOKE, R.F.; SCHUBACH K.M.; MARQUES R.S. et al. Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in beef cows. *J. Anim. Sci.*, v.95, p.1-8, 2017.

COOKE, R.F. et al. Effects of temperament on growth, plasma cortisol concentrations and puberty attainment in Nelore beef heifers. *The Animal Consortium*, p. 1-6, 2018.

COSTA MELLO, R. R.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B. de; PALHANO, H. B. Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 19, n. 1, p. 57-63, 2016.

COUTO, L. A.; COQUEIRO, J. S.; MARTIN, N. C. G. Bem-estar animal na bovinocultura de corte: uma revisão sistemática. *Profiscientia* nº14-2020, p. 177-193.

CRISPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JR, J.A. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Revista Vet Zootec*, v.16, p.335-342, 2009

CRISPILHO, A. M.; SÁ FILHO, M. F.; DELL'AQUA JR, J. A.; MONTEIRO, G. A.; AVANZI, B. R.; MARTINS, A.; PAPA, F. O. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin-based extenders. *Livestock Science*, v. 149, p. 1-6, 2012.

CRISPILHO, A.M.; NICHI, M.; GUAISTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; SÁ FILHO, M.F.; MAZIERO, R.R.D.; DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O. Sperm fertility and viability following 48 hours of refrigeration: Evaluation of different extenders for the

preservation of bovine semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, v.126, p.126-133, 2014.

CUNNINGHAM, James. *Tratado de fisiologia veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CZISZTER, L.T.; GAVOJDIAN, D.; NEAMT, R.; NECIU, F.; KUSZA, S. V.; ILIE, D.E. Effects of temperament on production and reproductive performances in Simmental dual-purpose cows *Journal of Veterinary Behavior*, v.15, p.50-55, 2016.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.743-752, 2000.

DIAS, E. A. R.; CAPANHOLI, S. P.; ROSSI, G. F.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA' JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; ZORZETTO, M. F.; PAZ, C. C. P.; OLIVEIRA, L. Z.; MERCADANTE, M. E. Z.; MONTEIRO, F. M. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine sêmen. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 102-111, 2018.

DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online*, v.30, p.14-27, 2015.

ELOY, M.X.; PEREIRA E.P. Estresse na reprodução de caprinos machos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.37, p.156-163, 2013.

FRIEDRICH, J.; BRAND, B.; SCHWERIN, M. Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding – a review. *Archives Animal Breeding*, v.58, p.13–21, 2015.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.249-265, 2001.

GILLAN, L., EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v. 63, p. 445-457, 2005.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science*, v.75, p.249-257, 1997.

GRAVES, C.N; EILER, H. Cortisol content of semen and the effect of exogenous cortisol on the concentration of cortisol and minerals (Ca, Mg, K and Na) in semen and blood plasma of bulls. *Biology Reproduction*, v. 21, p. 1225–1229, 1979.

GRIGNARD, L; BOIVIN, NEINDRE, P. L. Do beef cattle react consistently to different handling situations? *Applied Animal Behaviour Science*, v. 71, p. 263-276, 2001.

GRUMMER, R. R. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: management of the dry period. *Theriogenology*, 68 (Suppl.1), p. 281-288, 2007.

GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'ÁQUA, C.P.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G. A.; LISBOA, F.P.; PAPA, F.O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2012. *Animal Reproduction*, v.9, n.4, p.929, 2012.

HANSEN, B. G.; OSTERAS, O. Farmer welfare and animal welfare - Exploring the relationship between farmer's occupational well-being and stress, farm expansion and animal welfare. *Preventive Veterinary Medicine*, 170, 104741, 2019. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/e55c7a43-9bc1-3ecc-81b8-31db390d113a/>

HARDY, M. P.; GAO, H.; DONG, Q.; GE RWANG, Q.; CHAI, W.R. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Research*, v.322, p.147-153, 2005.

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C.E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*. v. 73, n.4, p.279-319, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.20787/epdf>>

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Series: Adv. Exp. Med. Biol., v.636, p.1-15, 2008. Disponível em: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-09597-4\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-09597-4_1)

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 141-424, 1994.

ITO, P. C.; GUZZO, R. S. L. Temperamento: características e determinação genética. *Psicol Reflex Crit*, 15: 425-436, 2002.

JOXKOW, P. M. D.; ROSSATO M. D. The impacto intese exercise on sêmen quality. *American Journal of Men's Health*, v.11, p. 654-662, 2017.

KASIMANICKAM, R. et al. Influence of temperament score and handling facility on stress, reproductive hormone concentrations, and fixed time AI pregnancy rates in beef heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 775–782, 2014.

KASIMANICKAM R.K.; HALL J.B.; ESTILL C.T; KASTELIC J.P.; JOSEPH, C.; ABDEL AZIZ R.L.; NAK, D. Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. *Theriogenology*, v.107, p.70-77, 2018.

KING, D.A.; SCHUEHLE PFEIFFER, C.E.; RANDEL, R.D.; WELSH Jr. T.H.; OLIPHINT, R.A.; BAIRD, B.E., CURLEY Jr., K.O.; VANN, R.C., HALE, D.S.; SAVELL, J.W.; Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, v.74, p.546–556, 2006.

KELLER, O. D.; ALVES, R. D. S.; LIZ, N. D.; NIGELISKII, A. F.; CARDOSO, S.; KINDLEIN, L. Relação dos indicadores de bem-estar no pré-abate de bovinos com a

presença de contusão de carcaças. Jornada NESPro (14.: 2019: Porto Alegre). Anais [recurso eletrônico] Porto Alegre: UFRGS, 2019.

LEROY J.L.M.R.; VAN SOOM A.; DE KRUIF, A.; LEROY, J.L.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows\*. *Reproduction Domestic Animal* v.43, p. 612–622, 2008.

LOCKWOOD, S.A.; KATTESH, H.G.; RHINEHART, J.D.; STRICKLAND, L.G.; KRAWCZEL, P.D.; WILKERSON, J.B.; KIRKPATRICK, F.D.; SAXTON, A.M. Relationships among temperament, acute and chronic cortisol and testosterone concentrations, and breeding soundness during performance testing of Angus bulls. *Theriogenology*, v.89, p.140-145, 2017.

LOPES, M. A.; MORAES, F.; CARVALHO, F. M.; PERES, A. A. C.; BRUHN, R. P.; REIS, E. M. B. Efeito do nível tecnológico na rentabilidade dos sistemas de produção de leite participantes do programa "Balde Cheio": um estudo multicaseos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 36, n.4, pág. 2909-2922, jul/ago de 2015. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/19173>

MACEDO, G.G.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; ABREU, U.G.P.; NEGRÃO, J.A.; COSTA E SILVA, E.V. Human-animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Tropical Animal Health Production*, v.43, p.1175-1182, 2011.

MACFARLANE, M.S.; BREEN, K.M.; SAKURAI, H.; ADAMS, B.M.; ADAMS, T.E. Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Animal Reproduction Science*, v.63, p.167-175, 2000.

MAFFEI, WE. Reatividade animal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.8, p.81-92, 2009.

MANUJA, K. B.; MANUJA, A.; AICH, P. Stress and its impact on farm animals. *Frontiers in Bioscience*, v.4, p.1759-1767, 2012.

MAZIEIRO, R.R.D.; MARTIN, I.; MATTOS, M.C.C.; FERREIRA, J.C.P. Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas Nelore submetidas a manejo diário ou manejo semanal. *Vet. Zootec.*, v.19, p.366-372, 2012.

MIASEL, R. et al. Severe antioxidant deficiency in human semen samples with pathological spermogram parameters. *Andrologia*, v. 29, p. 77–83, 1997.

MOBERG, G. P. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science*, New York, v. 74, p. 304-311, 1991.

MORRELL, J.M. Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, V. 153, P. 62-67, 2020.

PAPA, P.M.; MAZIEIRO, R.D.; GUAISTI, P.N.; JUNQUEIRA, C.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; PAPA, F.O.; VIANNA, F. P.; ALVARENGA, M. A.; CRESPILO,

A. M.; DELL'AQUA Jr., J. A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, v. 83, p. 107-113., 2015.

PARANHOS DA COSTA, M.J.R. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 18., 2000, Alfenas, Anais: Sociedade Brasileira de Etologia, 2000 p.26-42.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R. et al. Contribuição dos estudos de comportamento de bovinos para implementação de programas de qualidade de carne. In: F.da S. Albuquerque (org.) Anais do XX Encontro Anual de Etologia, p. 71- 89, 2002.

PETHERICK, J.C. A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. *Applied Animal Behaviour Science*, v.90, p. 185–205, 2005.

PIOVENSAN, U. 1988. Análise de fatores genéticos e ambientais na reatividade de quatro raças de bovinos de corte ao manejo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP. Jaboticabal. SP

RETANA-MARQUEZ, S. et al. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior*, v. 44, p. 327-337, 2003.

RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C.; WARNER, M.B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *Journal Animal Science*, v.62, p. 300–306, 1986.

ROCHE, J.R.; FRIGGENS, N.C.; KAY, J.K.; FISHER, M.W.; STAFFORD, K.J.; BERRY, D.P. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Dairy Science*, v. 92, p. 5769–5801, 2009.

RUEDA, P.M. Alterações comportamentais e hematológicas em vacas Nelore submetidas à protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. 2009. 55f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande.

RUEDA, P. M.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R. Efeito do treinamento na expressão do temperamento de bovinos e implicações no desempenho produtivo. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 28, 2010, Alfenas. Anais: Sociedade Brasileira de Etologia, 2010, p.220-224.

RUEDA, P.M.; SANT'ANNA, A.C.; VALENTE, T.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R. Impact of the temperament of Nelore cows on the quality of handling and pregnancy rates in fixed-time artificial insemination. *Livestock Science*, v.177, p.189–195, 2015.

RUSSI, L.S. Recursos humanos na inseminação artificial em bovinos de corte. 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS. 53p.

SILVA, A.; MAFEI, L.; DE ANDRADE BORDIN, R.; DA CUNHA, G. J. A rastreabilidade na cadeia da bovinocultura de corte brasileira. *Tekhne e Logos*, v. 9 n. 2, p. 20-35, 2018.

SILVA BRAGA, J.; MACITTELI, L.; DE LIMA, V. A.; DIESEL, T. O modelo dos “Cinco domínios” do bem-estar animal aplicado em sistemas intensivos de produção de bovinos, suínos e aves. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 19, n. 2, 2018.

SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V.; SOARES, G. J. D. Relação entre genótipo e o temperamento de novilhos em pastejo e seu efeito na qualidade da carne. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, p. 519-526, 2006.

STRADAIOLI, G.; PERIC, T.; MONTILLO, M.; COMIN, A.; CORAZZIN, M.; VERONEZE, M. C.; PRANDI, A. Hair cortisol and testosterone concentrations and semen production of *Bos taurus* bulls. *ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, 2017 VOL. 16, NO. 4, 631–639.

TODINI, L.; MALFATTI, A.; TERZANO, G.M.; BORGHESE, A.; PIZZILLO, M., DEBENEDETTI, A. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. *Theriogenology*, v.67, p.627-631, 2007.

VIEIRA-NETO, M. F.; SOUZA, C. E. A.; SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Consequências da degeneração testicular por estresse térmico sobre a qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes domésticos. *Ciência Animal*, v.29, n.3, p.87-97, 2019.

VOISINET, B.D.; GRANDIN, T.; TATUM, J.D.; O’CONNOR, S.F.; STRUTHERS, J.J. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science*, v.75, p.892–896, 1997.

VOLPI, J. H. Particularidades sobre o temperamento, a personalidade e o caráter, segundo a psicologia corporal, 2004. Disponível em: [www.centroreichiano.com.br/artigos.htm](http://www.centroreichiano.com.br/artigos.htm).

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 481-492, 2000.

WEBB, L.E.; VAN REENEN, C.G.; JENSEN, M.B.; SCHMITT, O.; BOKKERS, E. A. M. Does temperament affect learning in calves? *Applied Animal Behaviour Science*, v.165, p.33–39, 2015.

YOSHIDA C.; NAKAO T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. *J Reprod Dev*. 2005, v. 51 p.99-107.

ZERLOTTI MERCADANTE, M. E.; RAZOOK, A. G.; DE VASCONCELOS SILVA, J. A.; DE FIGUEIREDO, L. A. Body condition score of Nelore cows and its relationship with size and reproduction traits. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*. 2006. v. 14 (4) p.143-147.

ZOU, P.; SUN, L.; CHEN, Q.; ZHANG, G.; YANG, W.; ZENG, Y.; ZHOU, N.; L.I.Y.; LIU, J.; AO, L.; CAO, J.; YANG, H. Social support modifies an association between work stress and semen quality: Results from 384 Chinese male workers. *Journal of Psychosomatic Research*, v.117, p.65-70, 2019.