

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado em Medicina Veterinária

Karoline Maria Gil Braz

**TEMPERAMENTO ANIMAL PODE INFLUENCIAR O GANHO DE
PESO, QUALIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE
TOUROS?**

São Paulo
2019

Karoline Maria Gil Braz

**TEMPERAMENTO ANIMAL PODE INFLUENCIAR O GANHO DE
PESO, QUALIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE
TOUROS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador Prof. Dr. André Maciel
Crespilho.

Co-orientador Dr. Fábio Morato Monteiro.

São Paulo

2019

KAROLINE MARIA GIL BRAZ

**TEMPERAMENTO ANIMAL PODE INFLUENCIAR O GANHO DE
PESO, QUALIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE
TOUROS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho.

Co-orientador: Dr. Fábio Morato Monteiro.

São Paulo _____ de _____ 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Prof. Dr. Marcílio Nichi

Prof. Dr. Kléber da Cunha Peixoto Júnior

Conceito Final: _____

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a influência do temperamento animal sobre aspectos produtivos e reprodutivos de touros Nelore, testando-se a hipótese de que animais naturalmente mais reativos apresentam níveis mais elevados de cortisol além de redução nas concentrações séricas de testosterona que podem influenciar o ganho de peso, termorregulação e saúde testicular, qualidade e congelabilidade espermática. Para o estudo foram selecionados 24 touros hígidos da raça Nelore com idade entre 20 e 24 meses. Os animais foram submetidos à análise comportamental envolvendo escore de agitação (EA), mensuração da frequência cardíaca (FC), respiratória (FR) e avaliação da velocidade de saída do tronco de contenção (VS). A partir das avaliações comportamentais os touros foram classificados em 2 grupos: RE (reativos = animais mais agitados, assustados e/ou agressivos) e pouco reativos (PR = animais naturalmente mais calmos). Os touros foram acompanhados mensalmente por 4 meses através da dosagem de testosterona e cortisol séricos, ganho de peso diário e total, temperatura ocular e escrotal através de exame termográfico (Flir® T420) e avaliação da ecotextura testicular através de exame ultrassonográfico modo-B. Mensalmente foram colhidas amostras de sêmen (n=4 amostras/touro) através de eletroejaculação, que foram analisadas imediatamente após a colheita através de sistema computadorizado de análise (CASA). Adicionalmente, do grupo inicial de 24 animais foram selecionados 10 touros (n = 5 RE; n = 5 PR) para colheitas de sêmen destinadas à criopreservação. As amostras criopreservadas foram descongeladas e avaliadas quanto aos padrões cinéticos (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, produção de ânion superóxido e níveis de peroxidação lipídica utilizando-se citometria de fluxo (BD LSR Fortessa®). Os dados gerados foram submetidos à análise de variância (GLIMMIX®, SAS) sendo verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (Proc Univariate) e a homogeneidade das variâncias pelo Teste Qui Quadrado. Os touros do grupo RE apresentaram EA e VS superior em relação aos PR ($P < 0,0001$). Animais PR apresentaram maior ganho de peso médio diário (PR = 0,25 kg/dia; RE = 0,10 kg/dia; $P = 0,0418$) e total ao final dos 4 meses de avaliação (PR = $468,75 \pm 8,19$ kg; RE = $441,22 \pm 8,19$ kg; $P = 0,0195$), além de menores concentrações de cortisol sérico quando comparados aos touros RE. A temperatura ocular não diferiu entre os grupos; entretanto, touros RE apresentaram maior temperatura no polo distal testicular quando comparados aos PR ($33,56 \pm 0,24$ C°; $32,89 \pm 0,28$ C°; $P = 0,0180$; respectivamente). Não foram observadas diferenças na FC e FR entre os grupos. Na avaliação espermática não foram observadas diferenças para a cinética, integridade estrutural ou para o estresse oxidativo das células espermáticas criopreservadas comparando-se os diferentes grupos experimentais. Conclui-se que a reatividade animal exerce influência sobre os níveis de cortisol sérico, ganho de peso e capacidade de termorregulação testicular, não havendo, no entanto, influência sobre a congelabilidade e qualidade do sêmen pós-descongelação. Dessa forma, os resultados da pesquisa sinalizam para a necessidade de seleção animal com base em comportamento, estratégia que pode prevenir perdas relacionadas a queda de produtividade e eficiência reprodutiva de touros de corte.

Palavras chave: Estresse, reatividade animal, reprodução, comportamento, bem estar.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of temperament on productive and reproductive performance of Nelore bulls, testing the hypothesis that naturally more reactive animals have higher cortisol levels and a reduction in serum testosterone concentration that may influence the gain of Nelore bulls, weight, semen quality, sperm freezability. Temperament of 24 young bulls was assessed by pen score (PS), and flight speed (FS), measurement of heart rate (HR), respiratory rate (RR). Based on the results, bulls were divided into two categories according to their behavior: Reactive (n=12; stress animals) and calms (n=12; calm animals). Blood samples were collected from both groups for testosterone and cortisol analysis once a month for 4. Similarly, over 4 months semen was collected along with scrotal and ocular globe thermography (FLIR®) for further analysis, and evaluation of testicular echotexture by B-mode ultrasound examination, and body weight (BW) was recorded. Additionally, from the initial group of 24 animals, bulls 10 (n = 5 reactive; n = 5 calm) were selected for semen collections for cryopreservation. The cryopreserved samples were thawed and evaluated for kinetic standards (CASA), plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial potential, superoxide anion and lipid peroxidation levels using flow cytometry (BD LSR Fortessa®). The generated data were subjected to analysis of variance (GLIMIX, SAS) and the normality of the homogeneity of the variances by the Chi Square Test (Proc Univariae) and the homogeneity of the variances by the Chi Square Test. Calms animal presented higher average daily weight gain (Calm = 0.25 kg/day; Reactive 0.10 kg/day; $P = 0.0418$) and total at the end of the 4 months of evaluation (Calm = 468.75 ± 8.19 kg; Reactive 441.22 ± 8.19 kg; $P = 0.0195$). Reactive animals showed higher PS, and FS and lower BW than calms. Cortisol concentration in serum were lower in the calm group ($P < 0.05$), but serum testosterone concentrations did not differ between groups with distinct behavior. The scrotal thermography on reactive bulls presented higher. The scrotal thermography on reactive bulls presented higher temperature at the caudal pole of testicle ($P < 0.05$). However semen quality (volume, kinetics, structural integrity or oxidative stress of cryopreserved sperm cells comparing the different experimental groups). The results of this study demonstrated that bulls with reactive temperament were affected on their cortisol levels leading to loss of body weight and higher testicles temperature, but there is no influence on post-thaw freezing and semen quality. The research results indicate the need for behavior-based animal selection, a strategy that can prevent losses related to productivity reduction and reproductive efficiency of beef bulls.

Keywords: Stress, animal reactivity, reproduction, behavior, welfare.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Imagem ilustrando touros Nelores de 20 a 24 meses utilizados no estudo.
.....28
- Figura 2** - A esquerda imagem demonstrando animal do grupo reativo, apresentando expressão de medo (olhos arregalados, silaorréia, se virando no tronco); a direita animal calmo (olhar para frente, não se vira no tronco). Em ambas as imagens a pescoceira está aberta para avaliar a movimentação natural do animal.
.....30
- Figura 3** – Exemplo de imagens termográficas obtidas no estudo, ilustrando os diferentes pontos anatômicos de mensuração térmica. A: aferição da temperatura média (lados esquerdo e direito) do plexo pampiniforme (PP), regiões dorsais medianas e ventrais testiculares (T1, T2, T3) da cauda do epidídimo (TE); em B: aferição da temperatura de globo ocular.....31
- Figura 4** - Microplaca que compõe o Kit Testeronana SYM® empregada para leitura das concentrações séricas de testosterona em espectrofotômetro modelo Readwll Touch – Robonik®..... 33
- Figura 5** - Exemplo de imagem obtida com a ultrassonografia testicular, ilustrando as áreas selecionadas para avaliação da ecogenicidade testicular e quantificação de pixels..... 34
- Figura 6** - Equipamento Ivos-Ultimate (Versão 14.0, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA) empregado para às avaliações de cinética espermática 35

Lista De Tabelas

- Tabela 1** - Parâmetros comportamentais (n=6) utilizados para definir o escore de agitação (EA, escala de 4 a 16 pontos) manifesto por touros Nelore criados a pasto a partir da adaptação de Piovensan (1998).....29
- Tabela 2** - Resultados médios ($\pm$ DP) do escore de agitação (EA) e da velocidade de saída (VS; metro/ segundo) avaliados em dois momentos consecutivos no início do experimento (M1 e M2) para definição dos grupos experimentais (Pouco Reativos, PR; Reativos, RE) e ao final do estudo (MF).....38
- Tabela 3** - Resultados médios ($\pm$ DP) do exame termográfico escrotal e do globo ocular de bovinos Nelore, classificados de acordo com o padrão de temperamento animal (PR = Pouco Reativo; RE = Reativo).....41
- Tabela 4** - Resultados médios ($\pm$ DP) dos principais parâmetros cinéticos gerados pelo CASA (sistema de análise computadorizada) comparando-se a qualidade de sêmen in natura de animais pouco (PR) ou muito reativos (RE).....42
- Tabela 5** - Resultados médios ($\pm$ DP) dos parâmetros avaliados pelo CASA (sistema de análise computadorizada de sêmen) no sêmen pós-congelação. Onde RE: animais reativos; PR: touros do grupo pouco reativo43
- Tabela 6** - Resultados médios ($\pm$ DP) para os parâmetros MPLAI (membrana plasmática lesada e acrossomal ínter; %), MPAL (membrana plasmática e acrossomal lesada; %), MPAL (membrana plasmática e acrossomal íntegra; %), MPIAL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada) avaliados através do uso de sondas fluorescentes (Hoechst 33342, iodeto de propídio e FITC-PSA) em citometria de fluxo44
- Tabela 7** - Resultados médios ($\pm$ DP) da avaliação do potencial de peroxidação de membranas espermáticas, considerando a porcentagem de células peroxidadas, íntegras e lesadas de acordo com cada grupo experimental.44
- Tabela 8** - Resultados médios ($\pm$ DP) para o estresse oxidativo mensurado após o processo de criopreservação espermática e representado pela quantificação de ânions superóxidos.45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 O Bem-Estar Animal.....	12
2.2 O Temperamento Animal	13
2.3 Influência do Temperamento sobre a Produtividade Animal	15
2.4 Efeito do Estresse sobre a Performance Reprodutiva	16
2.5 O Estresse e a Espermatogênese.....	18
2.6 Princípios da Criopreservação Espermática.....	20
2.7 Análise do Sêmen Pós Criopreservação	21
2.8 Métodos Adicionais para Avaliação do Potencial Reprodutivo	23
2.8.1 <i>Ultrassonografia Testicular</i>	23
2.8.2 <i>Termografia por Infravermelho</i>	24
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Local e Participantes da Pesquisa.....	26
5.2 Animais	27
5.3 Análise Comportamental	28
5.3.1 <i>Escore de Agitação</i>	28
5.3.2 <i>Velocidade de saída</i>	30
5.4 Ganho de Peso	30
5.5 Exame Termográfico	31
5.6 Determinação Cortisol e Testosterona Séricos	32
5.7 Ultrassonografia Testicular.....	33
5.8 Coleta e Avaliação Espermática.....	34
5.9 Criopreservação Espermática	35
5.10 Avaliação de Funcional da Célula Espermática: Membrana Plasmática e Acrossomal (MPAI), Potencial Mitocondrial, Peroxidação Lipídica e geração de Ânions Superóxido	36
5.11 Análise Estatística	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Análise Comportamental	38

6.2 Avaliação do Ganho de Peso	39
6.3 Avaliações Hormonais.....	39
6.4 Avaliações por Imagem	40
6.4.1 Ultrassonografia Testicular.....	40
6.4.2 Termografia por Infravermelho	40
6.5 Análise do Sêmen <i>in Natura</i>	41
6.6 Análise do Sêmen Pós-Criopreservação.....	42
6.6.1 Avaliação da Integridade Estrutural e do Estresse Oxidativo	43
7 DISCUSSÃO	45
8 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Primeiramente a DEUS, que me permitiu chegar até aqui, que me capacitou e me concedeu essa honra.

A minha MÃE, que me deu todo apoio nas horas mais difíceis, que sempre entendeu minhas ausências, que fez tudo para realizar meu sonho.

Essa conquista é sua!

Agradeço ao meu Orientador André Maciel Crespilho, que me concedeu mais essa oportunidade. Obrigada por Todos os ensinamentos desde o início da minha formação, por ser referência na minha vida profissional!

Tem minha maior admiração!

Ao Prof. Dr. Kleber, que desde a graduação nos auxiliou nas pesquisas, no presente trabalho, e a todo ensinamento oferecido desde o início da minha formação.

Agradeço ao Dr. Fabio Morato Monteiro por nos auxiliar durante todo no projeto no Instituto de Zootecnia, À doutoranda Nayara e a mestrada Luana, a todos os estagiários que auxiliaram e contribuíram durante o experimento.

A Prof. Dra. Adriana Cortez pelo auxílio com as leituras hormonais.

Sem vocês nada disso seria possível!

Gratidão a UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA, que me tornou Médica Veterinária e agora MESTRE.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o tema “Bem-Estar Animal” vem ganhando maior destaque em todo o Mundo, especialmente pela maior conscientização e pressão do mercado consumidor, que tem exigido e fiscalizado a criação animal de modo humanitário.

Animais com baixo nível de bem estar podem apresentar estresse e reduzirem a capacidade de manter a homeostase. Na presença do estresse os animais podem apresentar modificações comportamentais associadas a alterações do sistema nervoso autônomo, neuroendócrino e adrenocortical.

Diversos estudos demonstraram que animais submetidos a manejo aversivo podem apresentar elevações nas frequências cardíaca e respiratória, além de níveis mais elevados de cortisol, hormônio associado ao estresse. Elevações nos níveis de cortisol podem inibir a atividade do hipotálamo, da hipófise e culminar com queda na produção de prolactina, somatotropina, TSH, além de interferir na produção e liberação das gonadotrofinas. Tais alterações podem influenciar negativamente na expressão do potencial genético animal, determinando menor produção de carne e leite, menor desenvolvimento corpóreo, menor resistência a doenças, atrasos na maturidade sexual e ainda culminar com redução nas taxas de fertilidade.

Estudos anteriores comprovaram a interação entre o temperamento do bovino com a susceptibilidade ao estresse. Dessa forma, considera-se que o temperamento pode determinar a forma e magnitude com que o animal responde a situações estressantes e o quanto essa condição pode influenciar a eficiência reprodutiva.

Estudos conduzidos na espécie humana demonstraram relação linear e negativa entre a elevação dos níveis de estresse e de cortisol plasmático com a qualidade das células espermáticas e produção de testosterona. Níveis elevados de cortisol reduzem a sensibilidade das gônadas ao LH e resultam na supressão de hormônios sexuais esteróides, influenciando diretamente a reprodução. Do ponto de vista endócrino, a testosterona é o hormônio que regula a espermatogênese; por essa razão, qualquer fator que altere o perfil de secreção de testosterona compromete diretamente a capacidade espermatogênica e performance reprodutiva animal.

Mesmo sendo notória a influência do estresse sobre aspectos reprodutivos na espécie humana, poucos estudos foram conduzidos para avaliação da influência do temperamento e estresse animal sobre a capacidade produtiva e reprodutiva de

touros, sobretudo da raça Nelore, considerada como uma das mais reativas dentre as demais raças zebuínas criadas em clima tropical. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do temperamento animal sobre aspectos produtivos e reprodutivos de touros Nelore, testando a hipótese de que animais mais reativos podem apresentar níveis mais elevados de cortisol, além de redução nas concentrações sérica de testosterona que podem influenciar o ganho de peso, saúde e capacidade de termorregulação testicular, qualidade e congelabilidade espermática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Bem-Estar Animal

A partir da década de 60, a União Europeia passou a estudar os diferentes sistemas de produção animal e a exigir a criação e manejo humanitário. De acordo com revisões anteriores, a preocupação com o “bem-estar” ganhou força através da concepção de que os animais são seres sencientes e que o bem-estar só pode ser garantido se fatores como sentimento e comportamento animal forem considerados durante o estabelecimento das diferentes estratégias de manejo animal (PETERS et al., 2010; BOND et al., 2012).

Em 1967 na Inglaterra foi criada a “Comissão de Bem-Estar de Animais de Produção” que posteriormente em 1979 foi renomeada para “Conselho de Bem-Estar dos Animais de Produção”. No ano de 1993 o conselho estabeleceu as cinco liberdades dos animais, representadas pelo direito de viverem livres de fome, sede e desnutrição; livres de temor e de angústia; de desconforto físico e térmico; livres de dor, de lesão e de doenças; e livres para manifestar seu comportamento natural (WEBSTER, 2001).

Embora haja esse consenso técnico e científico da necessidade de diversos cuidados pensando na cinco liberdades dos animais, muitas práticas de manejo utilizadas na rotina de uma fazenda causam estresse e desconforto, entretanto são inevitáveis, como vacinações, manejo de curral e marcação dos bovinos. Fatores potencializadores de estresse como agressão, gritos e uso de choques elétricos para condução dos animais devem ser evitados afim de reduzir o estresse animal.

Bovinos com maior nível de medo por estímulo humano dificultam ainda mais o manejo, reduzindo a distância de fuga e aumentando a agressividade (RUEDA; PARANHOS DA COSTA, 2010).

O temperamento e o treinamento dos funcionários associado ao condicionamento dos bovinos são fatores importantes para garantir o bem-estar e eficiência produtiva em todas as fases do ciclo pecuário. Interações positivas entre os funcionários e os animais durante o manejo no curral podem levar a redução significativa do nível de estresse, melhorar a fertilidade e a produtividade (RUEDA; PARANHOS DA COSTA, 2010).

A reprodução é um dos setores que mais sofre com o baixo nível de bem estar, já que raramente o estresse leva a infertilidade e sim a subfertilidade, de modo em que animais subférteis continuam no rebanho gerando custos, sem no entanto exercerem por completa sua capacidade reprodutiva (COSTA E SILVA et al., 2010).

2.2 O Temperamento Animal

A seleção animal com base no temperamento vem ganhando importância devido a recentes estudos que demonstraram sua associação com eficiência produtiva e reprodutiva (FORDYCE et al., 1985). Diversos autores relataram efeito negativo do temperamento sobre o ganho de peso (VOISINET et al., 1997; SILVEIRA et al., 2008; PALES et al., 2016), além de quedas da fertilidade relacionadas ao temperamento mais agressivo (MACEDO et al., 2011; COOKE et al., 2017).

O conceito “temperamento animal” é considerado amplo e complexo, pois envolve diversas características individuais como docilidade, mansidão, medo, curiosidade e reatividade (PARANHOS DA COSTA et al., 2002). Por definição, o temperamento pode ser considerado como a reação do animal, de modo individual, a determinados estímulos, normalmente associado ao medo (GRIGNARD; BOIVIN; NEINDRE, 2001).

O medo é um fator altamente estressante, sons ou visões desconhecidas são reconhecidas como sinal de perigo (GRANDIN, 1997). Segundo Fordyce et al. (1985), o temperamento dos bovinos é expresso por meio de respostas comportamentais durante o manejo, e geralmente é avaliado por meio de técnicas padronizadas que medem o nível de reatividade, de medo, agitação ou

agressividade. Portanto, pode-se considerar que a reatividade é um indicador importante do comportamento, onde se faz a avaliação da reação do animal frente a algum manejo, como pesagem e contenção (BOIVIN et al., 1992).

Diversos testes tem sido utilizados para avaliar a reatividade animal, como o teste de contenção, onde é possível avaliar o quanto o animal se movimenta e força a saída em um tronco de contenção, sendo atribuído a ele um escore de agitação (EA). Maffei (2009) realizou o teste de contenção de forma objetiva com o uso de um dispositivo eletrônico que aferia a frequência em que o animal se movimentava dentro do tronco.

Outro modo de avaliar a reatividade é realizar o teste de distância de fuga, que é considerada a menor distância em que o animal deixa que o examinador se aproxime sem ter reação a essa aproximação (FRASER, 1980).

Um dos parâmetros mais utilizados para estimar a reatividade é a velocidade de saída (VS), e de acordo com Burrow et al. (1988) e Petherick et al. (2002; 2003) esse parâmetro de avaliação é altamente repetível e apresenta moderada herdabilidade.

O teste de velocidade de saída tem alta correlação com reatividade e pode ser implementado facilmente em estudos que objetivam avaliar temperamento. Para a realização do teste, é cronometrado o tempo decorrido entre a liberação do animal do tronco de contenção, até alcançar em linha reta um determinado ponto. De acordo com Vettters et al. (2013), animais que apresentam menores velocidades de saída são considerados menos reativos e animais com maiores velocidade de saída considerados de maior reatividade (VETTERS et al., 2013).

Desse modo, autores consideraram a velocidade de saída como uma ferramenta valiosa na avaliação do temperamento de bovinos, indicando uma possível resposta ao estresse de manejo (CURLEY et al., 2006). Em outro estudo com animais zebuínos e taurinos, também foi observada correlação positiva entre velocidade de saída e reatividade (SILVEIRA et al., 2008).

A velocidade de saída também tem sido correlacionada com eficiência reprodutiva. Estudos utilizaram a velocidade de saída para selecionar por temperamento vacas de corte na IATF. Os autores observaram taxa de prenhez cerca de 17% menor em vacas com maiores velocidades de saída (COOKE et al., 2011). Além de correlações reprodutivas, também foi observada correlação com parâmetros de produtividade. Patherick et al. (2003), trabalhando com garrotes

Brahman, observaram que bovinos com velocidade de saída superior apresentaram menor ganho de peso.

2.3 Influência do Temperamento sobre a Produtividade Animal

Sabe-se que o temperamento animal pode influenciar o ganho de peso corporal em bovinos. De acordo com Cooke et al. (2009), 3 fatores principais podem ser apontados para justificar a interação negativa entre o estresse e a capacidade de ganho de peso corpóreo na espécie bovina. De acordo com os autores, animais de temperamento mais reativo dispendem mais tempo em estado de alerta para reagir contra possíveis ameaças do que consumindo alimento, desse modo reduzem a ingestão de alimentos. Uma segunda explicação reside no fato de que o alimento ingerido deveria gerar energia para o ganho de peso; no entanto, nesses animais mais reativos esses nutrientes são desviados para sustentar seu padrão comportamental. Outra hipótese é que animais mais reativos possuem cortisol mais elevado, hormônio esse que estimula o metabolismo, a degradação de tecidos corporais, como gordura e musculatura, com o objetivo de gerar energia para ajudar na resposta comportamental, culminando com menor ganho de peso.

Trabalhando com bovinos de diferentes grupos genéticos, Pales et al. (2016) observaram correlação dos níveis de cortisol com ganho de peso em animais confinados, sendo que animais que apresentaram menores níveis de cortisol sérico exibiram maior ganho de peso ao final do período de confinamento. Outro estudo avaliando diversas raças bovinas também demonstrou que animais mais reativos apresentaram déficit de 10 a 14% de ganho de peso diário, quando comparados a animais mais calmos (VOISINET et al., 1997).

Estudos anteriores também observaram efeito do genótipo sobre a produtividade, onde Touros zebuínos considerados mais reativos que animais taurinos, também demonstraram apresentar menor ganho de peso. Nesse contexto, avaliando garrotes Charolês x Nelore em confinamento, Silveira et al. (2008) observaram que bovinos Nelores foram mais reativos que animais taurinos e ainda que animais de temperamento mais reativo apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos de temperamento mais calmo.

2.4 Efeito do Estresse sobre a Performance Reprodutiva

Diversos trabalhos tem demonstrado que estímulos estressores podem promover a ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA) e que essa ativação pode inibir o eixo hipotálmo hipófise gonadal (HHG). Estímulos estressores chegam ao sistema nervoso central e ao hipotálamo, onde ocorre a liberação de corticotropina (CRH) e beta endorfinas. Na hipófise o CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a glândula adrenal à liberação de cortisol e catecolaminas. Por sua vez, as catecolaminas estimulam a resposta de “luta ou fuga” e elevam a frequência cardíaca e respiratória. Como os estímulos estressantes são capazes desencadear alterações hormonais que provocam elevação da frequência cardíaca e do cortisol, esses fatores podem ser utilizados como indicadores de estresse animal (MATTERI, CARROLL; DYER, 2000).

Qualquer estímulo que desencadeie o estresse animal pode promover a ativação do sistema nervoso autônomo e ativação do HHA, resultando em elevações nos níveis plasmáticos de cortisol e reduzindo a sensibilidade das gônadas ao LH, resultando na supressão de hormônios sexuais esteróides, com consequente impacto na capacidade reprodutiva (CARLSON, 2002).

Há evidências de que bovinos de temperamento mais reativo apresentam ativação mais intensa e prolongada do eixo HHA (COOKE et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2014). Em bovinos, o estresse promove elevação plasmática dos níveis de cortisol (EDWARD; RAHE; GRIFFIN, 1987), sendo que a concentração basal é de 5 a 10 µg/dL para vacas holandesas (YOSHIDA; NAKAO, 2005). De acordo com Cunnigham (2004), a resposta do cortisol ao agente estressor é imediata e proporcional a magnitude desse agente.

Elevações nos níveis de cortisol afetam o hipotálamo na liberação de GnRH, a hipófise na liberação de LH e FSH e, em consequência, afetam também as gônadas, pela falta de estímulo gonadotrófico para produção de hormônios esteróides (BREEN; KARSCH, 2004). Trabalhando com ovelhas ovariectomizadas Breen et al. (2005) observaram que elevações nas concentrações de cortisol plasmático foram capazes de reduzir a frequência dos pulsos de LH, demonstrando que o cortisol atua diretamente a nível hipotalâmico, diminuindo a secreção pulsátil de GnRH.

Macfarlane et al. (2000) também observaram que altas concentrações de cortisol foram capazes de reduzir a fertilidade de ovelhas por suprimir o desenvolvimento folicular, atrasar a liberação de estradiol pré-ovulatório e interferir negativamente no pico de LH.

De acordo com Macedo et al. (2011), doadoras de embrião Nelore que apresentam problemas de interação homem-animal durante o manejo de inseminação artificial e durante a superovulação possuem níveis mais elevados de cortisol, demonstrando maior nível de estresse e, por consequência, apresentando menores taxas de desenvolvimento embrionário. Além disso, os mesmos autores afirmaram que o tempo de exposição ao estresse também influencia na taxa de fertilidade; dessa forma, animais submetidos ao estresse de forma crônica podem apresentar queda no desempenho reprodutivo.

Na avaliação da interação entre temperamento e fertilidade em programas de inseminação artificial em tempo fixo, Cooke et al. (2017), observaram que vacas Nelore mais reativas apresentaram menores taxas de fertilidade quando comparadas a animais de temperamento calmo.

Em estudo realizado com touros Angus, Lockwood et al. (2016) avaliaram a concentração de testosterona, cortisol sérico e cortisol presente no pelo de animais reativos e calmos, não sendo observadas diferenças entre os grupos estudados. Entretanto, os autores verificaram maiores concentrações de cortisol no início do experimento e um decréscimo com o decorrer dos dias. A partir desses resultados, os autores concluíram haver processo de habituação, onde os animais se acostumaram com o manejo.

Além da influência da reatividade sobre machos bovinos, foi observado que Novilhas Nelores mais reativas apresentaram menor crescimento, aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol e atraso para atingir a puberdade quando comparadas a novilhas de temperamento mais calmo (COOKE et al., 2018). Vacas com temperamento mais reativo apresentaram menores concentrações de progesterona e maiores concentrações de cortisol, prostaglandina e substância P, substâncias essas todas correlacionadas ao estresse (KASIMANICKAM et al., 2014).

O efeito do temperamento no desempenho de bovinos e adaptação ao ambiente de confinamento foi estudado por Braga et al. (2018). Os autores avaliaram o peso e morfometria da glândula adrenal em animais submetidos a diferentes áreas de confinamento, e concluíram que animais mais reativos quando

submetidos a piquetes com menores dimensões apresentam glândulas adrenais com maior peso. Esse resultado demonstrou, indiretamente, que bovinos com maior nível de reatividade apresentam níveis de cortisol mais elevados e respondem com maior magnitude a situações estressantes. Conclusões semelhantes foram descritas por Curley et al. (2006), o autor demonstrou que touros Bhraman mais reativos apresentaram menor capacidade de lidar com situações estressantes quando comparados a animais de temperamento mais calmo. Animais considerados mais reativos apresentaram reações fisiológicas exageradas, demonstrada pelos níveis mais elevados de cortisol sérico.

2.5 O Estresse e a Espermatogênese

Sabe-se que diversos fatores podem afetar a fertilidade do macho e, por consequência, a qualidade espermática, tais como alterações congênitas, estresse térmico, estresse oxidativo (HANSEN, 2009), nutrição inadequada, uso de drogas que deprimem a espermatogênese, além de doenças endócrinas (DURAIRAJANAYAGAM; ARGAWAL; ONG, 2005).

Um estudo realizado em humanos demonstrou que o estresse é capaz de exercer influência sobre a qualidade espermática por meio de fatores neuroendócrinos que interferem na espermatogênese; de acordo com os autores, o estresse provoca aumento nas concentrações séricas de glicocorticóides, interferindo diretamente na produção de GnRH e por consequência levando a menor produção de testosterona pelas células de Leydig testiculares (HARDY et al., 2005).

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 e performance reprodutiva animal (O'DONNELL et al., 2001).

Em uma pesquisa onde foi avaliada a influência do estresse térmico sobre caprinos machos, os autores observaram que independente do fator desencadeante do estresse, a liberação de ACTH pela adenohipófise pode suprimir a liberação do LH, inibir a produção de testosterona e reduzir a libido dos machos. Dessa forma, concluíram que a redução do estresse é essencial para se obter sucesso durante a estação de monta, visto que todo tipo de estímulo estressante pode resultar em

alterações fisiológicas e comprometer o desempenho reprodutivo (ELOI; PEREIRA, 2013).

Apesar do estresse poder promover a redução da concentração sérica de testosterona (ELOI; PEREIRA, 2013), ainda não há um consenso sobre o quanto o estresse pode interferir na qualidade espermática. Lockwood et al. (2016) avaliaram a influência do temperamento de touros Angus sobre a qualidade de sêmen *in natura* e concluíram que sob estresse os animais dessa raça apresentaram elevação dos níveis de cortisol sem, no entanto, influenciar a cinética espermática.

Autores demonstraram que a queda na testosterona provocada pelos altos níveis de cortisol pode comprometer a função epididimária (BARTH; BOWMAN, 1994), levando a prejuízos na espermatogênese. Em diversas espécies, o estresse foi capaz de reduzir a qualidade seminal, reduzir a motilidade espermática e aumentar os defeitos morfológicos dos espermatozoides (MIESEL et al., 1997; BARTH, 1993; HATAMOTO et al., 2006; RETANA-MÁRQUEZ et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que 20 minutos após aplicação intravenosa de corticosteróide, ocorre aumento da concentração de cortisol no plasma seminal (GRAVES; EILER, 1979). Esses resultados mostraram que o cortisol sérico pode ser transferido rapidamente para o sêmen e culminar com quedas da qualidade espermática. Nesse contexto, outro experimento mostrou que espermatozoides incubados em meio contendo cortisol apresentaram redução da capacidade fertilizante (BRIGGS, 1973).

Outros mecanismos podem explicar a relação do estresse com a queda na qualidade do sêmen. Agentes estressores podem provocar o aumento de células espermáticas anormais (MIESEL et al., 1997; LOOKWOOD, et al. 2016). Espermatozoides anormais podem aumentar a produção de EROS (SAID et al. 2005). Nesse contexto, altos níveis de estresse podem aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) no plasma seminal, resultando em estresse oxidativo que culmina com a redução da qualidade espermática (ESKIOCAK; ESKIOCAK; GOZEN, 2005; KAO et al., 2008).

2.6 Princípios da Criopreservação Espermática

A criopreservação do sêmen tem sido expandida nos últimos anos, com o objetivo de aumentar o potencial reprodutivo de touros de alto valor zootécnico, sendo essa ferramenta essencial nos programas de inseminação artificial, além disso, é responsável pela prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (VERBERCKMOES et al., 2005; LEITE et al., 2011).

A utilização do sêmen congelado permite o rápido avanço genético dos rebanhos comerciais e permite a escolha de reprodutores que atendam de melhor maneira os objetivos da produção (LEITE et al., 2011). A criopreservação possibilita o armazenamento de células espermáticas por um longo prazo (BOSCARATO; MARTINS, 2014), e esse material genético pode ser utilizado nos programas de IA e IATF, e também na produção in vitro de embriões (PIVE).

O processo de criopreservação do sêmen consiste na utilização de crioprotetores específicos que possibilitam o armazenamento das doses de sêmen, por período indeterminado em nitrogênio líquido a -196°C . No processo de criopreservação, a temperatura do sêmen deve diminuir da temperatura corpórea (37°C) para a ambiente (20°C). Esta queda na temperatura, aparentemente, não causa danos aos espermatozóides, desde que estejam diluídos em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, em que o sêmen pode ser severamente danificado; em bovinos essa faixa é compreendida entre 5 e 15°C (AGCA; CRITSER, 2002). A esta temperatura, os lipídios da membrana plasmática passam por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996). Se o espermatozóide não for resfriado apropriadamente nesta faixa crítica, ele sofrerá danos que poderão resultar em perda da motilidade e fertilidade (WATSON, 1995). A congelação das células espermáticas ocorre entre as temperaturas de 0 a -40°C , e é nesta faixa que podem ocorrer os principais danos às células espermáticas (WOLFE; BRYANT, 2001).

Embora seja um procedimento comum na indústria da inseminação artificial, os protocolos de congelamento espermático utilizados ainda resultam em considerável número de espermatozóides que não resistem ao processo, o que compromete a fecundação do ovócito e reduz as taxas de prenhez (NEYGI et al., 2004). Durante o processo de criopreservação, o espermatozoide passa por desafios como o

resfriamento, a congelação e posterior descongelação. De modo em que nessas etapas podem ocorrer danos celular.

Para minimizar os danos ocasionados pela criopreservação, diversos diluidores e crioprotetores tem sido utilizados. Em uma primeira fase da criopreservação espermático, é realizada a diluição do sêmen em meios específicos para garantir a movimentação celular (PAPA et al, 2008). Sua composição influencia na sobrevivência espermática durante o processamento e na refrigeração ou congelação (CRESPILO, 2007), fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fertilização dos espermatozoides bovinos (PRADO et al., 2012). Os diluentes são substâncias iônicas e não-iônicas que mantêm a osmolaridade e tamponam o meio; sendo compostos por um crioprotetor, uma fonte de lipoproteína e aditivos (BERTOL et al., 2014).

A função dos agentes crioprotetores é proporcionar nutrientes como fonte de energia; proteger contra o efeito prejudicial do resfriamento rápido; evitar variações de pH à medida que o ácido láctico é formado; manter a pressão osmótica e o equilíbrio eletrolítico; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do sêmen e proteger os espermatozoides durante a congelação (HAFEZ, 2004). Os principais crioprotetores bovinos são os açúcares: o glicerol, o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (BERTOL et al., 2014). Como fonte de lipoproteína para proteger contra o choque térmico são usados a gema de ovo (MADEIRA et al., 2013), o leite de vaca integral homogeneizado, o leite desnatado fresco ou reconstituído, a água de coco e a lecitina de soja (LEITE et al., 2011). Os aditivos empregados na criopreservação são as enzimas antioxidantes e os antibióticos (LEITE et al., 2011; BERTOL et al., 2014).

2.7 Análise do Sêmen Pós Criopreservação

Diversas tecnologias tem sido utilizadas para avaliação do sêmen criopreservado, onde podemos citar a avaliação computadorizada da cinética espermática, uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, testes hipoosmóticos, sexagem espermática, avaliação de proteínas do plasma seminal e ainda a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ARRUDA; CELLEGHINI, 2003).

Dentre as tecnocologias citadas, a avaliação da integridade de membrana espermática apresenta grande importância. Nesse contexto, sabe-se que o espermatozoide necessita de diversos atributos de qualidade para obter sucesso no processo de fertilização do oócito. Dentre os parâmetros diretamente relacionados à capacidade de fertilização espermática destaca-se a integridade de membrana plasmática - IMP (PESCH e BERGMANN, 2006).

Naturalmente o processo de criopreservação leva a danos significativos aos espermatozoides (CELEGHINI et al., 2008). Nesse contexto, os danos sofridos durante o processamento do sêmen podem resultar na redução da viabilidade espermática, incluindo lesões à membrana plasmática, acrossomal e ao potencial mitocondrial (WATSON, 2000). A avaliação da membrana espermática acrossomal e do potencial mitocondrial possui grande importância visto que a membrana plasmática está correlacionada com a viabilidade espermática e capacidade de fecundação, e o potencial mitocondrial com a produção de energia celular (GRAVANCE et al., 2001)

Durante o processo de criopreservação ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) sendo os principais o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH). Uma das principais consequências da produção excessiva de EROS corresponde a peroxidação dos lipídeos da membrana espermática, fenômeno que não apenas deprime a motilidade e como também impede o desencadeamento de todos os processos que dependem da integridade da membrana plasmática da célula, incluindo a ligação com o ovócito e exocitose das vesículas acrossomais (CRESPILHO et al., 2014).

Altas concentrações de EROS são prejudiciais ao espermatozoides, porém uma concentração mínima deve existir, sendo que o ânion superóxido é a EROS responsável pela ativação da motilidade do espermatozoide e pelo aumento da afinidade da célula espermática aos receptores da zona pelúcida. Já o peróxido de hidrogênio é um fator controlador da capacitação por meio da ativação da PKA (fosfoquinase), auxilia na fosforilação da tirosina, sensibilizando os canais de cálcio levando a capacitação espermática e reação de acrossoma (LE CLERC et al., 1997).

Dentro das EROS, peróxido de hidrogênio é considerado o radical livre mais importante devido a sua capacidade de atravessar livremente a membrana e assim inibir diversas enzimas e funções do espermatozoide e com isso reduz o sistema antioxidante do espermatozoide (MICHAEL et al., 2007).

A peroxidação da membrana lipídica ocorre devido a estresse oxidativo, e ocorre quando as ERO se sobressaem ao sistema antioxidante de defesa. Lipídios poli-insaturados compoem a membrana do espermatozoide, o que a torna extremamente sensível ao ataque por radicais livres (SANOCKA; KURPISZ, 2004).

A peroxidação lipídica leva perda da integridade da membrana plasmática, através de uma cascata de eventos que resulta em um decréscimo na fosforilação de proteínas do axonema e na imobilização espermática, ambos associados com a redução da fluidez da membrana, diminuindo motilidade, além de causar efeitos deletérios aos eventos de fusão da membrana do espermatozoide, como a reação acrossômica e fusão do espermatozoide com o oócito, desse modo, qualquer lesão na membrana espermática pode ocasionar déficit na fertilidade (GHARAGOZLOO; AITKEN, 2011).

2.8 Métodos Adicionais para Avaliação do Potencial Reprodutivo

2.8.1 Ultrassonografia Testicular

Um modo de se estimar a performance reprodutiva de touros representa o exame ultrassográfico dos testículos. A análise de imagens ultrassonográficas pode fornecer informações substanciais sobre a função e estrutura dos tecidos (BARTH, 2002).

Uma imagem ultrassonográfica é composta por pixels e valores numéricos de pixels que refletem as características do tecido examinado. Uma análise numérica de pixels ou da ecogenicidade testicular pode fornecer informações sobre o desenvolvimento dos testículos e estruturas acessórias reprodutivas (PIERSON; ADANS, 1995).

Estudos com a ultrassonografia testicular tem sido realizados para estimar se há correlação entre a ecogenicidade testicular e qualidade seminal. Em uma pesquisa com touros de corte, submetidos insolação escrotal, os autores não observaram essa relação, entretanto observaram que a intensidade de pixels foi um preditor da futura qualidade de sêmen. Após a recuperação do processo degenerativo induzido pela insolação escrotal, os touros com maior ecogenicidade testicular apresentaram melhor qualidade espermática (ARTEAGA; BARTH; BRITO, 2005).

O uso da ultrassonografia testicular tem se mostrado uma ferramenta valiosa para determinação da puberdade e da maturidade sexual em bovinos. Foi observado um aumento da ecogenicidade testicular durante o desenvolvimento sexual em touros de corte, sendo que a maior ecogenicidade foi encontrada no início de 2 a 3 anos de idade, com máxima intensidade de pixels aos 34 meses de idade (BRITO et al., 2012). Além disso, foi relatada também existência de correlação entre a idade e a ecogenicidade testicular, e que pode haver correlação com a produção de testosterona sérica. Dessa forma se faz útil a avaliação da ecogenicidade testicular através da ultrassonografia em modo B dos testículos (CHANDOLIA et al., 1997)

2.8.2 Termografia por Infravermelho

Outra técnica importante e que tem contribuído para estimar a capacidade reprodutiva é o uso da termografia por infravermelho (KASTELIC, 2001). A termografia é um exame de imagem não invasivo, e seu princípio é baseado na energia eletromagnética irradiada pelos corpos, sendo composta pelo fluxo de fótons, que são partículas de massa atômica, de modo em que cada fóton se movimenta em um padrão de onda, se deslocando com a velocidade da luz (KLEIBER, 1975).

Todos os corpos formados de matéria emitem determinada carga de radiação infravermelha, e essa radiação pode ser captada em um termograma que expressa o gradiente térmico em um padrão de cores (EDDY; VANHOOGMOED; SNYDER, 2001). A radiação emitida pelo corpo do animal está diretamente relacionada ao grau de perfusão sanguínea do local e a taxa de metabolismo dos tecidos, o que pode ser captado pela câmera termográfica (ROBERTO; SOUZA, 2014).

Devido a sua utilidade para detectar pequenas mudanças na temperatura corporal, a partir de meados dos anos de 1990, a termografia infravermelha foi proposta como ferramenta de apoio na avaliação andrológica de touros (KASTELIC, 2001). Foi demonstrado que animais com padrão anormal de temperatura testicular podem apresentar maior percentual de espermatozoides anormais quando comparados a animais com temperatura testicular normal (LUNSTRA; COULTER, 1997). Outros autores também utilizaram a termografia por infravermelho na avaliação andrológica de touros, como Gabor et al. (1998), que demonstrou que a técnica pode estimar o número de espermatozoides viáveis em uma amostra de

sêmen, portanto o uso da câmera termográfica se faz útil na avaliação andrológica de touros.

Além da avaliação andrológica, a termografia infravermelha também pode ser utilizada na avaliação de respostas a estímulos aversivos ao manejo (STEWART et al., 2008). A análise da emissão de calor por termografia infravermelha foi validada para a avaliação de respostas ao estresse em suínos (PULIDO-RODRÍGUES et al., 2017), bovinos (STEWART et al., 2007) e cavalos (COOKE et al., 2001). No final dos anos 80, pesquisadores estudaram o estresse de transporte em bovinos, e observaram que sob estresse, ocorria aumento de catecolaminas, resultando em vasoconstrição periférica detectada pela da termografia infravermelha como quedas temperatura superficial da pele (STWART et al., 2005).

Atualmente a temperatura ocular mensurada através de termografia infravermelha tem sido utilizada para estimar o grau de estresse animal. Foi observada queda na temperatura ocular em vacas leiteiras após estímulo ameaçador (NAKAYAMA et al., 2005). Outros autores também demonstraram pela termografia infravermelha redução na temperatura ocular de vacas submetidas a cateterização da veia jugular, caracterizada como resposta a dor (STEWART et al., 2007).

A avaliação da temperatura de globo ocular também foi realizada em touros cruzados para avaliar resposta ao estresse animal (STEWART et al., 2008). Touros cruzados foram submetidos a manejos aleatórios: 1) contenção; 2) breve estímulo elétrico; 3) gritos; Foi observado que após a contenção e os gritos a temperatura do globo ocular caiu entre 0 e 20 segundos após os tratamentos e retornou a linha de base após 180 segundos. Entretanto, após o estímulo elétrico, mesmo após cinco minutos, a temperatura não retornou a temperatura inicial. Os autores concluíram que a termografia foi capaz de detectar respostas ao medo e/ou dor aos procedimento, desse modo ela pode ser útil para avaliar a aversão as práticas de manejo utilizadas.

A termografia infravermelha em suínos também pode ser útil na avaliação do bem-estar. Em leitões, foi verificado correlação entre níveis de cortisol salivar, temperatura ocular máxima e temperatura superficial do dorso durante as duas primeira semanas após desmame. Os autores concluíram que a termografia medida na região ocular representa um indicador confiável para a condição de estresse agudo (PULIDO-RODRÍGUES et al., 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Diversos trabalhos na área médica demonstraram que o estresse provoca aumento dos níveis de cortisol em homens, prejudicando a qualidade seminal (MCGRADY, 1984; HARDY et al., 2005; KAO et al., 2008; JOXKOW; ROSSATO, 2017). Em Medicina Veterinária também foi comprovado que estímulos rotineiros empregados como práticas de manejo também são capazes de elevar os níveis de cortisol de animais de produção (DOBSON; SMITH, 2000; MACFARLANE et al., 2000; MACEDO et al., 2011; ELOY; PEREIRA, 2013; LOCKWOOD et al., 2016). No entanto, a maior parte dos trabalhos realizados anteriormente apenas relacionam o estresse e o aumento dos níveis de cortisol com a queda de performance reprodutiva em fêmeas, sendo escassas as publicações recentes e conclusivas a respeito da interação entre temperamento, qualidade e criopreservação de sêmen, o que justifica a realização de novos estudos.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do temperamento animal sobre os aspectos produtivos e reprodutivos de touros de corte, testando a hipótese de que animais naturalmente mais reativos apresentam níveis mais elevados cortisol sérico além de reduções nas concentrações séricas de testosterona que podem influenciar o ganho de peso, saúde e capacidade de termorregulação testicular, qualidade e congelabilidade espermática.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Participantes da Pesquisa

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santo Amaro – UNISA, São

Paulo/SP (protocolo nº 06/2018), de acordo com os preceitos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

A pesquisa foi desenvolvida de forma multicêntrica junto ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal da UNISA, o Instituto de Zootecnia (IZ), Sertãozinho, SP, a empresa privada Vetsemen® situada na Rua Capricórnio 64, Alphaville Conde I, Barueri, SP, e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP.

Para o desenvolvimento do estudo o Instituto de Zootecnia figurou como entidade responsável por ceder os animais e por proporcionar estrutura física e laboratorial para avaliação do sêmen *in natura* e pelas criopreservações espermáticas. O laboratório privado VetSemen e a FMVZ-UNESP Botucatu foram responsáveis pelas análises do sêmen congelado. Na Universidade Santo Amaro foram realizadas às avaliações hormonais, tabulação e análise dos dados.

5.2 Animais

Para o trabalho foram selecionados 24 touros da raça Nelore com idade entre 20 e 24 meses (Figura 1), hígidos, nascidos no próprio IZ e sem histórico de doenças anteriores, criados a pasto (*Brachiaria brizantha*) e com acesso *ad libitum* a fontes de água. Todos os animais foram submetidos à exame clínico geral e reprodutivo atestando plena condições de saúde.

Todos os touros foram acompanhados por 4 meses (agosto a novembro de 2018), sendo submetidos a avaliações comportamentais ao início (M1 e M2) e ao final do estudo (MF). Além disso, todos os animais foram avaliados mensalmente quanto a expressão de características produtivas e reprodutivas, de acordo com metodologia exemplificada nos tópicos abaixo.

Figura 1 - Imagem ilustrando touros Nelores de 20 a 24 meses utilizados no estudo.



Fonte: (o autor, 2018).

5.3 Análise Comportamental

5.3.1 Escore de Agitação

Foram realizadas avaliações comportamentais envolvendo escore de agitação (EA, escore de 4 a 16), mensuração da velocidade de saída do tronco de contenção (VS, m/s), além da avaliação das frequências cardíaca (bpm) e respiratória (mpm) com o uso de estetoscópio. As avaliações comportamentais foram conduzidas em 3 momentos: no início (M1 e M2: duas avaliações consecutivas para caracterização dos grupos experimentais) e ao final do estudo (MF: em novembro de 2018).

O EA foi determinado pela associação dos padrões de comportamento e movimentação espontânea do animal durante a contenção física no tronco, sem a utilização da pescoceira para imobilização da cabeça (Figura 2). Para essa avaliação foi criada uma escala numérica a partir da adaptação de Piovensan (1998). De acordo com a avaliação etológica realizada em M1 e M2, os animais que receberam escore de 4 a 7 foram classificados como pouco reativos (PR), sendo àqueles que receberam pontuação entre 8 a 16 agrupados como na animais reativos (RE), de acordo com a Tabela 1. O etograma que compõe o escore de agitação foi avaliado imediatamente após a entrada do animal no tronco de contenção tendo duração de 30 segundos. Todas as avaliações comportamentais foram conduzidas pelo mesmo avaliador, previamente treinado para execução da atividade.

Tabela 1 - Parâmetros comportamentais (n=6) utilizados para definir o escore de agitação (EA, escala de 4 a 16 pontos) manifesto por touros Nelore criados a pasto a partir da adaptação de Piovensan (1998).

Características comportamentais	Pontuação			
	1	2	3	4
Deslocamento (DESL)	Nenhum deslocamento	Pouco DESL; parado por pelo menos metade do tempo	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, olhos relaxados	Alerta, movimentos bruscos, olhos arregalados, força a saída do tronco	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 - A esquerda imagem demonstrando animal do grupo reativo, apresentando expressão de medo (olhos arregalados, silaorréia, se virando no tronco); a direita animal calmo (olhar para frente, não se vira no tronco). Em ambas as imagens a pescoceira está aberta para avaliar a movimentação natural do animal.



Fonte: (o autor, 2018).

5.3.2 Velocidade de saída

Para a mensuração da VS (“flying speed”) foi cronometrado o tempo médio dispendido pelo animal para deixar o tronco de contenção após a abertura da porta de saída e percorrer 2 metros de distância em linha reta. A velocidade média foi calculada a partir da divisão da distância percorrida/tempo dispendido no percurso de 2 metros (BURROW, 1988).

No teste de VS foi considerado que quanto maior o tempo dispendido pelo animal para percorrer a distância entre a saída do tronco e o local determinado, mais dócil (e menos reativo) foi classificado seu temperamento; em contrapartida, quanto maior a sua velocidade mais reativo foi classificado seu comportamento (SILVEIRA et al., 2006).

5.4 Ganho de Peso

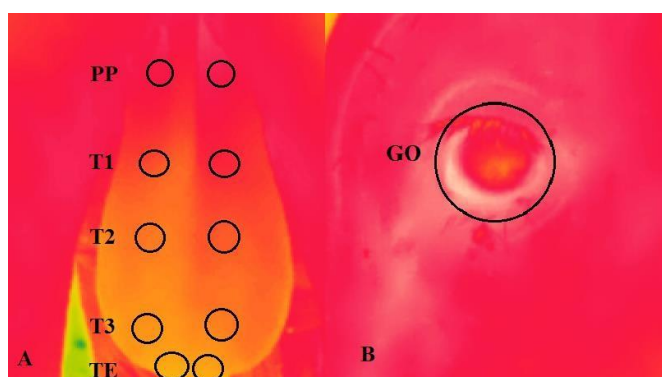
Todos os animais foram submetidos a pesagem mensal (n=4 avaliações) através de balança digital previamente calibrada, acoplada ao tronco de contenção. Os resultados gerados foram considerados como variáveis dependentes do grau de reatividade de cada bovino. Foi registrado o peso corporal (PC) e avaliado o ganho de peso médio diário (GPD), que foi calculado a partir das variáveis peso inicial e peso ao final de 4 meses de estudo.

5.5 Exame Termográfico

Todos os animais foram submetidos à avaliação termográfica utilizando o equipamento Flir T420®, Flir Systems Inc. (Boston, MA, USA), de acordo com Ramires Neto et al. (2012). Todas as avaliações termográficas foram conduzidas no período da manhã, sendo realizada a calibragem da câmera termográfica à cada 30 minutos, de acordo com a umidade e temperatura ambiente local. Previamente a análise, não houve nenhum toque manual e de nenhum instrumento nos testículos e na região ocular para que não fosse alterada a temperatura da superfície a ser avaliada.

Todas as imagens termográficas foram obtidas após cada análise etológica, respeitando-se uma distância de 1,0 entre a câmera e as superfícies corpóreas a serem avaliadas. Para o estudo foram consideradas as temperaturas médias da região de plexo pampiniforme, região dorsal, média e ventral do escroto, temperatura do epididímo, além da temperatura de globo ocular (Figura 3). Cada imagem gerada foi armazenada no próprio equipamento e posteriormente transferida para análise computacional através do software FLIR Tools® versão 3.1.13080.1002. Todas as avaliações foram realizadas em ambos os testículos, sendo estabelecida uma média entre as mensurações dos lados direito e esquerdo para fins de análise estatística

Figura 3 – Exemplo de imagens termográficas obtidas no estudo, ilustrando os diferentes pontos anatômicos de mensuração térmica. A: aferição da temperatura média (lados esquerdo e direito) do plexo pampiniforme (PP), regiões dorsais medianas e ventrais testiculares (T1, T2, T3) da cauda do epidídimo (TE); em B: aferição da temperatura de globo ocular.



Fonte: (O autor, 2019).

5.6 Determinação Cortisol e Testosterona Séricos

Amostras de sangue para determinação de cortisol e testosterona foram obtidas mensalmente (n=4) através de venopunção coccígea utilizando tubos a vácuo (Vacutainer®, BD, Curitiba, Brasil) de 10 mL com ativador de coágulo. Todas as amostras sanguíneas foram obtidas no período matutino, sempre conduzidas após as avaliações comportamentais individuais, evitando-se possíveis interferências na condução do etograma. Após cada coleta foi respeitando período mínimo de 20 minutos para formação dos coágulos sanguíneos, sendo realizada a centrifugação das amostras a 500 x g/ 10 minutos. O soro resultante foi dividido em alíquotas iguais, acondicionado em tubos plásticos de 1,5 mL, identificados e armazenados a -18°C até o momento das análises conduzidas na Universidade Santo Amaro – UNISA.

A quantificação do cortisol sérico foi realizada a partir de Kit ELISA DBC® (Dorchester, Ontario, Canadá), segundo metodologia adaptada de Titto et al. (2010) e Bozzo et al. (2018). Para cada avaliação as amostras de soro foram descongeladas até atingir temperatura ambiente. 20 µL de cada calibrador, do controle e de cada amostra foram pipetados nos poços correspondentes, sendo realizadas em duplicata. Em seguida, 100 µL da solução de conjugado de trabalho foram dispensados em todos os poços. A microplaca foi incubada sob agitação (200 rpm) por 45 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, os poços foram lavados por 3 vezes com 300 µL de solução de lavagem diluída. 150 µL de substrato TMB foi pipetado em todos os poços de ensaio. Novamente a placa foi incubada sob agitação por 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, ou até que o calibrador desenvolvesse uma coloração azul escuro. Para interrupção das reações foi adicionado 50 µL de solução de parada em todos os poços, respeitando-se o tempo de incubação de 20 minutos. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro modelo Readwwll Touch – Robonik® (Thane, District, Índia), empregando filtro de 450 nm.

As concentrações séricas de testosterona também foram quantificadas através de ELISA empregando-se Kit Testeronana SYM® (Leme, São Paulo, Brasil), de acordo com metodologia adaptada de Woźniak et al. (2016). Para o teste 10 µL das amostras de soro foram descongeladas e pipetadas em seus respectivos poços, juntamente, além de 10 µL de cada padrão, que foram dispensados em suas

respectivas cavidades. 50 µL de conjugado peroxidase diluído foram pipetados em todas as cavidades, exceto na do branco. A placa foi submetida a agitação delicada e 50 µL de conjugado biotina foi adicionado em todas as cavidades, excluindo-se a do branco. A microplaca foi coberta com etiqueta adesiva, novamente agitada e incubada por 60 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação as cavidades foram lavadas 5 vezes com 300 µL de solução própria de lavagem. 100 µL de solução cromógeno-substrato foram adicionados em todas as cavidades, respeitando-se novo período de incubação de 15 minutos ao abrigo da luz. Decorrido o último período de incubação foram pipetados 100 µL de solução bloqueadora em todas as cavidades, realizando-se a leitura das amostras após 20 minutos em espectrofotômetro modelo Readwll Touch – Robonik® (Thane, District, Índia) dotado de filtro de 450 nm (Figura 4).

Figura 4 - Microplaca que compõe o Kit Testeronana SYM® empregada para leitura das concentrações séricas de testosterona em espectrofotômetro modelo Readwll Touch – Robonik®.



Fonte: (o autor, 2018).

5.7 Ultrassonografia Testicular

Avaliações ultrassonográficas foram conduzidas mensalmente entre agosto e novembro (N= 4 avaliações) de 2018 utilizando aparelho Z5 Mindray® (Shenzhen, China), dotado de transdutor linear (frequência de 7,5 MHz), calibrado de acordo com recomendações da empresa fabricante (ganho de imagem 92, foco 1). Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo examinador. Previamente ao exame, os testículos foram limpos e secos com papel toalha descartável. Gel acústico foi aplicado sobre o escroto para maior contato entre a pele e o transdutor.

O transdutor foi posicionado verticalmente (paralelo ao eixo longitudinal dos testículos), sendo realizadas varreduras nos testículos direito e esquerdo. As imagens foram armazenadas no próprio equipamento e, posteriormente, recuperadas e analisadas através do software computacional Image J® (National Institutes of Health, MD, EUA).

A intensidade de pixels (IP), definida como a média de pontos luminosos que compõem as imagens ultrassonográficas (Tomlinson, et al., 2017) foi determinada em seis áreas de 10 mm de diâmetro, dispostas paralelamente ao mediastino (três pontos dorsais e três ventrais ao mediastino) de cada testículo avaliado, de acordo com figura 5.

Figura 5 - Exemplo de imagem obtida com a ultrassonografia testicular, ilustrando as áreas selecionadas para avaliação da ecogenicidade testicular e quantificação de pixels.



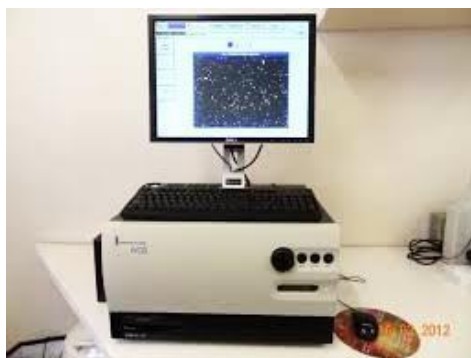
Fonte: (O autor, 2019).

5.8 Coleta e Avaliação Espermática

Todos os animais foram submetidos a coletas mensais de sêmen (n= 4 amostras de cada reprodutor) através de eletroejaculação. Os estímulos elétricos foram aplicados inicialmente com pequena intensidade e aumento progressivo, por 3 a 8 segundos de duração e 20 segundos de intervalo, conforme resposta do reprodutor. O volume, coloração e aspecto dos ejaculados foram avaliados subjetivamente no próprio tubo graduado de coleta. Após as avaliações macroscópicas, a cinética espermática foi determinada através de sistema computadorizado de análise, CASA (IVOS II®, Hamilton Thorn, Beverly, USA)

mostrado na figura 6, considerando os parâmetros de motilidade espermática total (MT) e progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilinear (VCL); amplitude lateral de cabeça espermática (ALH), frequência de batimentos flagelares (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP). Para todas as avaliações cinéticas foi utilizado o setup preconizado por Papa et al. (2015) para análise de sêmen bovino.

Figura 6 - Equipamento Ivos-Ultimate (Versão 14.0, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA) empregado para às avaliações de cinética espermática.



Fonte: (o autor, 2018).

A concentração espermática da amostra de sêmen foi determinada depositando 20 μ L de sêmen *in natura* em microcubetas descartáveis, que foram lidas imediatamente em Fotômetro SDM 1 (Minitube®, Tiefencach, Germany), previamente calibrado para espécie bovina.

Adicionalmente, amostras de sêmen foram fixadas em solução formol-salino tamponado a 2% e, posteriormente, foram realizadas avaliações de morfologia espermática através de preparações úmidas para leitura em microscopia de contraste diferencial de fase sob imersão (aumento de 1000x). Para análise morfológica foram contabilizados 200 espermatozoides por amostra, classificando os defeitos em maiores, menores e totais, de acordo com Blom (1973).

5.9 Criopreservação Espermática

Cinco reprodutores de cada grupo foram selecionados (tendo como critério extremos de comportamento). Os touros tiveram os ejaculados aproveitados para

criopresevação espermática de acordo com a metodologia proposta por Papa et al. (2015).

Cada amostra de sêmen foi diluída em meio comercial Botu-Bov® (BB, Botupharma, Brasil), respeitando-se a concentração final de 60×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente à diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, França) e foram transferidas para um refrigerador digital programável (Minitübe®, Tiefenbach, Alemanha) para estabilização a 5°C por 4 h. A congelação foi realizada em vapor de nitrogênio líquido (N₂) colocando as amostras a distância de 5 cm acima do nível do N₂ em uma caixa isotérmica de 42 litros pelo período de 20 min. Decorrido este período, as amostras foram imersas diretamente em N₂ e armazenadas em recipiente criobiológico para posterior análise laboratorial de qualidade.

As palhetas congeladas foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos, homogeneizadas em tubos graduados descartáveis previamente aquecidos e avaliadas quanto aos padrões cinéticos (CASA).

5.10 Avaliação de Funcional da Célula Espermática: Membrana Plasmática e Acrossomal (MPAI), Potencial Mitocondrial, Peroxidação Lipídica e geração de Ânions Superóxido

Todas as avaliações funcionais da célula espermática foram conduzidas em citometria de fluxo utilizando o equipamento BD LSR Fortessa® (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), equipado com lasers de excitação azul (488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm e 695/40nm), vermelho (640-nm, 40 mW com filtro 660/20nm) e violeta (405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50nm). No mínimo 10.000 células foram analisadas em cada amostra e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ v 6.1. Para as avaliações as amostras foram diluídas em TALP-PVA (PARRISH et al., 1988) modificado: 100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL.

Para a análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizada a associação de Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI) e FITC-PSA

(aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína), de acordo Freitas-Dell'Aqua (2012). Para esse protocolo alíquotas de 200µL de sêmen previamente diluído foram adicionadas a 7µM de H342, 1,5µM de PI e 2ng de FITC-PSA e incubadas por 5 minutos à 37°C ao abrigo da luz. Nessa avaliação foram identificadas e contabilizadas 4 subpopulações espermáticas: células portadoras de membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (MPLAI, %); membrana plasmática e acrossomal lesadas (MPAL, %); membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI, %) e membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (MPIAL).

Para avaliação do potencial mitocondrial e produção de ânions superóxido (O₂) na matriz mitocondrial foi utilizada a associação de Hoechst 33342, Yopro® (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada), MitoStatus Red® (MST; potencial mitocondrial) e MitoSOXTM Red® (MSR; geração de ânion superóxido na matriz mitocondrial), de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2018). Para esse teste amostras de 500µL de sêmen diluído receberam 7µM Hoechst 33342, 25nM YP, 20µM de MST e 2µM de MSR, respeitando-se período de incubação de 20 minutos a 37°C.

Para análise de peroxidação lipídica utilizou-se protocolo preconizado por Guasti et al. (2012), utilizando a probe C11-BODYPY® (D-3861; Molecular Probes). Para essa avaliação foi adicionado 5µM de C11BODIPY581/591 em 500 µL de sêmen previamente diluído em TALP-PVA, realizando-se a incubação por 30 minutos à 37°C. Após a incubação foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos com TALP-PVA, sendo o pellet resultante ressuspensionado em 300µL de TALP-PVA.

5.11 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS® Institute Inc., Cary, USA), sendo verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (Proc Univariate) e a homogeneidade das variâncias comparada pelo Teste Qui Quadrado. Os dados foram submetidos à análise de variância (Proc GLM), considerando-se como efeitos principais o grau de reatividade animal sobre as concentrações de testosterona e cortisol, peso e parâmetros de qualidade do sêmen bovino *in natura* e pós-descongelamento. Adicionalmente foi realizada análise de variância com medidas

repetidas no tempo (Proc GLM) para verificação das possíveis interações do tratamento com as diferentes rotinas experimentais sobre FC, FR, VS, resultados do EA e dosagens hormonais. Para essas análises foi utilizado método de comparação de médias ajustadas através do recurso LSMEANS do SAS. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Análise Comportamental

De acordo com a avaliação comportamental 12 animais foram considerados pouco reativos e 12 como reativos/estressados, havendo diferenças ($P < 0,001$) no EA entre os grupos não apenas no início, como também ao final das rotinas experimentais (Tabela 2).

Não houve diferenças entre os grupos pouco ou muito reativos, respectivamente, para os resultados médios de frequência cardíaca ($69,41 \pm 2,50$ e $68,51 \pm 2,53$; $P = 0,8010$) e respiratória ($34,74 \pm 1,86$ e $36,57 \pm 1,86$; $P = 0,4898$). Em média a VS foi superior para os animais reativos ($RE = 4,72 \pm 1,87$ e $PR = 3,35 \pm 1,46$; m/s; $P = 0,0044$) havendo, no entanto, variação nos resultados obtidos para esse parâmetro em cada uma das rotinas de avaliações comportamentais (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados médios ($\pm DP$) do escore de agitação (EA) e da velocidade de saída (VS; metro/ segundo) avaliados em dois momentos consecutivos no início do experimento (M1 e M2) para definição dos grupos experimentais (Pouco Reativos, PR; Reativos, RE) e ao final do estudo (MF).

Momentos	Parâmetros	PR	RE	P Valor
M1	EA	$5,00 \pm 2,17^a$	$10,91 \pm 2,60^b$	$<0,001$
	VS	$3,47 \pm 1,80^a$	$4,44 \pm 2,31^a$	0,4679
M2	EA	$5,41 \pm 2,31^a$	$11,25 \pm 4,11^b$	$<0,001$
	VS	$2,79 \pm 0,87^a$	$4,94 \pm 1,78^b$	0,0023
MF	EA	$6,33 \pm 3,47^a$	$12,16 \pm 3,01^b$	$<0,001$
	VS	$3,89 \pm 1,49^a$	$4,75 \pm 1,62^a$	0,1722

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($P < 0,05$)

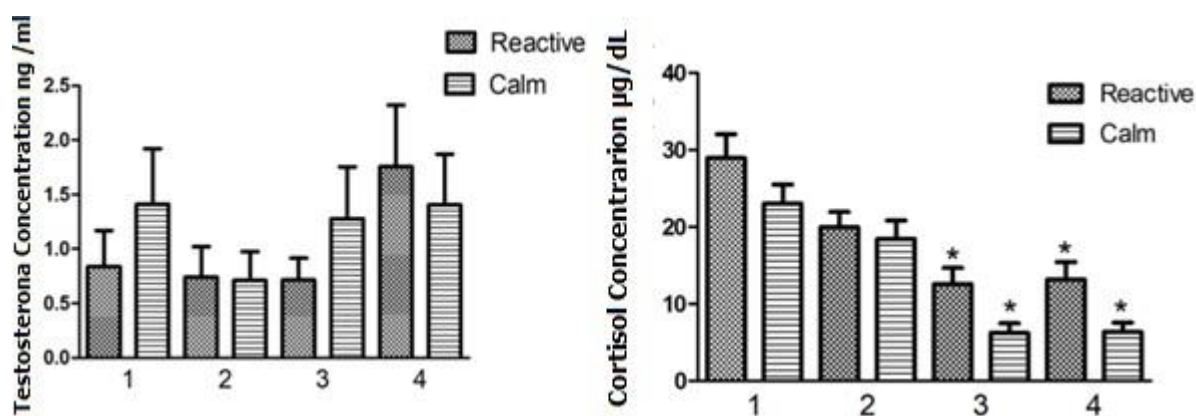
6.2 Avaliação do Ganho de Peso

Animais pouco reativos apresentaram maior peso corporal ($PC = 468,75 \pm 8,19$ kg; $P = 0,0195$) e ganho médio diário de peso ($GPD = 0,25$ kg / dia; $P = 0,0418$) quando comparados a touros reativos ($PC = 441,22 \pm 8,19$ kg; $GPD = 0,10$ kg / dia).

6.3 Avaliações Hormonais

Observou-se alto coeficiente de concordância para as quantificações de cortisol ($R^2 = 0,9585$) e testosterona séricos ($R^2 = 0,9641$) avaliados por ELISA. Touros reativos apresentaram níveis mais altos de cortisol do que touros pouco reativos ($P = 0,0449$). Nos dois grupos, foi identificada uma redução nos níveis séricos de cortisol ao longo das rotinas experimentais, conforme ilustrado no Gráfico 1. A concentração média de testosterona não sofreu variação entre os touros em função do temperamento animal ($1,11 \pm 0,22$ e $1,31 \pm 0,22$ ng/mL, respectivamente, para animais reativos e pouco reativos; $P = 0,5364$).

Gráfico – 1: Concentração sérica média para os hormônios testosterona (esquerda) e cortisol (direita) avaliados mensalmente durante 4 meses (rotinas 1 a 4), de acordo com cada grupo experimental (Calm = Touros considerados pouco reativos; Reactive = touros considerados de temperamento mais reativo).



*Diferenças estatísticas encontradas dentro de cada rotina experimental.

6.4 Avaliações por Imagem

6.4.1 Ultrassonografia Testicular

De forma geral não foram observadas diferenças para a ecotextura testicular entre os grupos estudados, com exceção dos resultados da primeira avaliação ultrassonográfica onde foram observados maiores valores de ecogenicidade testicular para os animais reativos quando comparados aos animais pouco reativos ($RE = 90,21 \pm 1,77$; $PR = 82,23 \pm 1,70$; $P = 0,0012$).

Em todos os grupos avaliados, independente da rotina experimental foi visibilizado parênquima testicular com ecotextura heterogênea. Menor quantidade de pixels formadores de imagens ultrassonográficas foram visibilizados nos pontos situados ventralmente a esquerda ($59,15 \pm 1,94$; $53,66 \pm 1,94$; $p = 0,0458$), e maior quantidade de pixels foi visualizada dorsalmente e central ao mediastino testicular ($RE = 93,58 \pm 1,97$; $PR = 90,20 \pm 1,91$; $p = 0,2181$).

6.4.2 Termografia por Infravermelho

Não foram observadas diferenças para a temperatura de globo ocular entre os grupos estudados. Em todos os grupos foi observado um gradiente decrescente de temperatura entre os polos dorsal e ventral do escroto, sendo maiores temperaturas médias aferidas na região de plexo pampiniforme, seguida pelas áreas T1, T2, T3 e cauda do epidídimo, independente do grupo experimental ($P < 0,05$). Embora não tenham sido evidenciadas diferenças para a temperatura do plexo pampiniforme, animais pouco reativos apresentaram menor temperatura em T3 ($P = 0,0180$) quando comparados aos touros reativos. Além disso, houve tendência ($P < 0,1$) para menor temperatura para os animais pouco reativos nas regiões T1, T2 e TE, como mostra a tabela Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados médios ($\pm$ DP) do exame termográfico escrotal e do globo ocular de bovinos Nelore, classificados de acordo com o padrão de temperamento animal (PR = Pouco Reativo; RE = Reativo).

Local	PR	RE	P VALOR
PP	35,61 ^a $\pm$ 0,29	35,88 ^a $\pm$ 0,35	0,3138
T1	34,71 ^a $\pm$ 0,25	35,30 ^a $\pm$ 0,20	0,0932
T2	33,65 ^a $\pm$ 0,25	34,25 ^a $\pm$ 0,07	0,0766
T3	32,89 ^a $\pm$ 0,28	33,56 ^b $\pm$ 0,24	0,0180
TE	32,41 ^a $\pm$ 1,52	31,60 ^a $\pm$ 1,18	0,0937
GO	35,96 ^a $\pm$ 0,93	35,76 ^a $\pm$ 0,91	0,4441

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). Dados referentes a aferição térmica média de cada região anatômica ao longo de 4 rotinas experimentais. Onde: PP: área do plexo pampiniforme; T1: polo dorsal do testículo; T2: região centro testicular; T3: polo ventral do testículo; TE: cauda do epidídimo; GO: temperatura de globo ocular.

6.5 Análise do Sêmen *in Natura*

Todos os animais apresentaram características seminais dentro dos padrões mínimos de qualidade preconizados para o sêmen bovino, de acordo com os parâmetros e valores de referência preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Os resultados da cinética espermática encontram-se na Tabela 4. Não houve diferença entre os grupos avaliados. Da mesma forma, o temperamento dos animais não influenciou o volume do sêmen (RE = $7,49 \pm 0,59$; PR = $7,22 \pm 0,70$ mL; P = 0,7222), concentração de espermatozoides (RE = $315,72 \times 10^6 \pm 52,18$; PR = $266,42 \times 10^6 \pm 37,30$ espermatozoides / mL ; P = 0,4415), porcentagem de defeitos espermáticos maiores (RE = $14,74 \pm 2,28$; PR = $18,81 \pm 2,89$; P = 0,2793), menores (RE = $8,43 \pm 1,58$; PR = $7,01 \pm 0,81$; P = 0,4140) ou defeitos espermáticos totais (RE = $22,74 \pm 3,05$; PR = $26,06 \pm 1,90$; P = 0,4333).

Tabela 4 - Resultados médios ($\pm$ DP) dos principais parâmetros cinéticos gerados pelo CASA (sistema de análise computadorizada) comparando-se a qualidade de sêmen in natura de animais pouco (PR) ou muito reativos (RE).

Parâmetros CASA	PR	RE	P Valor
MT (%)	79,85 ^a $\pm$ 2,38	82,59 ^a $\pm$ 2,58	0,4384
MP (%)	56,89 ^a $\pm$ 2,38	57,42 ^a $\pm$ 2,58	0,8804
VAP(μ m/s)	107,69 ^a $\pm$ 2,57	109,90 ^a $\pm$ 2,77	0,5621
VSL (μ m/s)	86,89 ^a $\pm$ 2,05	84,86 ^a $\pm$ 2,22	0,5063
VCL (μ m/s)	186,79 ^a $\pm$ 6,50	193,63 ^b $\pm$ 7,02	0,4772
ALH (μ m)	7,11 ^a $\pm$ 0,24	7,35 ^a $\pm$ 0,26	0,5132
BCF (Hz)	39,54 ^a $\pm$ 0,78	28,54 ^a $\pm$ 0,84	0,0862
STR (%)	79,28 ^a $\pm$ 1,13	77,88 ^a $\pm$ 1,22	0,4011
LIN (%)	49,08 ^a $\pm$ 1,27	47,73 ^a $\pm$ 1,37	0,4768
RAP(%)	77,32 ^a $\pm$ 2,42	80,57 ^a $\pm$ 2,61	0,3657

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). Onde, MT (motilidade total; %), MP (motilidade progressiva; %), VAP (velocidade do trajeto; μ m/s), VSL (velocidade retilinear; μ m/s) VCL (velocidade curvilinear; μ m/s), ALH (amplitude lateral de cabeça espermática; μ m), BCF (frequência de batimentos flagelares; Hz), STR (retilinearidade; %), LIN (linearidade, %) e RAP (espermatozoides com movimento rápido).

6.6 Análise do Sêmen Pós-Criopreservação

Na avaliação da cinética espermática realizada com o CASA pós criopreservação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos pouco reativos e reativos. Os resultados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados médios ($\pm$ DP) dos parâmetros avaliados pelo CASA (sistema de análise computadorizada de sêmen) no sêmen pós-congelação. Onde RE: animais reativos; PR: touros do grupo pouco reativo.

Parâmetros CASA	PR	RE	P VALOR
MT (%)	32,65 ^a $\pm$ 4,60	29,00 ^a $\pm$ 4,40	0,5749
MP (%)	18,90 ^a $\pm$ 2,64	16,60 ^a $\pm$ 2,50	0,5225
VAP (μ m/s)	53,70 ^a $\pm$ 2,20	51,15 ^a $\pm$ 2,10	0,4097
VSL (μ m/s)	42,10 ^a $\pm$ 1,70	41,60 ^a $\pm$ 1,70	0,8363
VCL (μ m/s)	70,85 ^a $\pm$ 3,20	70,05 ^a $\pm$ 3,05	0,8613
ALH (μ m)	2,55 ^a $\pm$ 0,15	2,60 ^a $\pm$ 0,10	0,8785
BCF (Hz)	8,50 ^a $\pm$ 0,30	8,80 ^a $\pm$ 0,30	0,4946
STR (%)	78,50 ^a $\pm$ 1,10	78,90 ^a $\pm$ 1,00	0,7789
LIN (%)	60,15 ^a $\pm$ 1,60	59,10 ^a $\pm$ 1,50	0,6432
RAP (%)	20,40 ^a $\pm$ 3,10	17,30 ^a $\pm$ 2,90	0,4717

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). Onde, MT (motilidade total; %), MP (motilidade progressiva; %), VAP (velocidade do trajeto; μ m/s), VSL (velocidade retilinear; μ m/s) VCL (velocidade curvilinear; μ m/s), ALH (amplitude lateral de cabeça espermática; μ m), BCF (frequência de batimentos flagelares; Hz), STR (retilinearidade; %), LIN (linearidade, %) e RAP (espermatozoides com movimento rápido).

6.6.1 Avaliação da Integridade Estrutural e do Estresse Oxidativo

Não foram observadas diferenças para a quantificação de nenhuma das subpopulações espermáticas definidas a partir da análise estrutural de integridade de membrana plasmática e acrossomal em citometria de fluxo como mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Resultados médios ($\pm$ DP) para os parâmetros MPLAI (membrana plasmática lesada e acrossomal ínter; %), MPAL (membrana plasmática e acrossomal lesada; %), MPAI (membrana plasmática e acrossomal íntegra; %), MPIAL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada) avaliados através do uso de sondas fluorescentes (Hoechst 33342, iodeto de propídio e FITC-PSA) em citometria de fluxo.

Membrana e Acrossomo	PR	RE	P VALOR
MPLAI (%)	33,30 ^a $\pm$ 2,82	33,40 ^a $\pm$ 2,12	0,9630
MPAL (%)	24,10 ^a $\pm$ 2,40	24, 50 ^a $\pm$ 2,07	0,8980
MPAI (%)	41,90 ^a $\pm$ 3,63	41,10 ^a $\pm$ 2,87	0,8488
MPIAL (%)	0,75 ^a $\pm$ 0,132	1,10 ^a $\pm$ 0,25	0,2606

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($P < 0,05$). Onde, RE: animais pertencentes ao grupo Reativos; PR: Pouco Reativos.

Também não foram observadas diferenças para o estresse oxidativo das células espermáticas criopreservadas, comparando-se os grupos experimentais RE e PR, segundo dados apresentados na tabela 7 e na tabela 8.

Tabela 7 - Resultados médios ($\pm$ DP) da avaliação do potencial de peroxidação de membranas espermáticas, considerando a porcentagem de células peroxidadas, íntegras e lesadas de acordo com cada grupo experimental.

Celular	PR	RE	P VALOR
Peroxidadas (%)	26,40 ^a $\pm$ 2,66	25,30 ^a $\pm$ 3,11	0,7926
Íntegras (%)	23,30 ^a $\pm$ 3,33	20,50 ^a $\pm$ 2,69	0,5185
Lesadas (%)	74,70 ^a $\pm$ 3,33	79,50 ^a $\pm$ 2,69	0,5185

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). Onde, RE: animais pertencentes ao grupo Reativos; PR: grupo Pouco Reativos.

Tabela 8 - Resultados médios ($\pm$ DP) para o estresse oxidativo mensurado após o processo de criopreservação espermática e representado pela quantificação de ânions superóxidos.

Ânion Superóxido	PR	RE	P VALOR
Integras (%)	26,40 ^a $\pm$ 3,65	24,50 ^a $\pm$ 2,75	0,6789
Lesadas (%)	73,65 ^a $\pm$ 3,65	74,55 ^a $\pm$ 2,70	0,6789
O ₂ (%)	69,40 ^a $\pm$ 3,95	69,60 ^a $\pm$ 2,50	0,9631

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). Onde, RE: animais pertencentes ao grupo Reativos; PR: grupo Pouco Reativos.

7 DISCUSSÃO

Dentro do nosso conhecimento esse foi o primeiro estudo que avaliou a influência do temperamento sobre a qualidade do sêmen de touros Nelore. A grande maioria dos trabalhos anteriores se dedicaram a avaliação da influência do estresse sobre a performance produtiva e reprodutiva de fêmeas bovinas (KASIMANICKAM et al., 2014; COOKE et al., 2017; COOKE et al., 2018) sendo escassas, até o momento, informações a respeito das possíveis interações entre comportamento e reatividade animal sobre a performance reprodutiva de touros de corte.

Em nosso trabalho foi observado que o padrão de comportamento animal identificado na classificação inicial (M1 e M2) se manteve até o final do experimento (MF), não sendo registrados casos de touros RE ou PR que apresentaram comportamento discrepante em relação ao seu grupo experimental primariamente definido.

Entretanto, foi observado que alguns animais reativos tenderam a apresentar temperamento mais dócil ao longo das rotinas experimentais. Tais resultados possivelmente se justificam pelo padrão inato de comportamento bovino, que naturalmente sofrem condicionamento a medida que são submetidos a maior número de interações com humanos ao longo das rotinas de manejo (PARANHOS DA COSTA et al., 2002; CHIQUITELLI NETO et al., 2011). Tais conclusões se assemelham às reportadas por Curley et al. (2006) que também observaram

aumento da docilidade em touros Brahman quando manejados no mesmo curral ao longo de um período de 120 dias estudo.

Em concordância aos resultados comportamentais também foi observada redução significativa dos níveis de cortisol sérico ao longo das rotinas experimentais, independente do comportamento inicial que permitiu a separação dos reprodutores de acordo com o grau de reatividade. Tais resultados sugerem a habituação dos bovinos ao modelo experimental proposto, refletindo em diminuição dos níveis de medo e estresse associados ao manejo. De acordo com Lockwood et al. (2016), a medida que touros de corte sofrem adaptação e aclimatação ao ambiente de criação pode-se observar redução significativa dos níveis de cortisol plasmático, justificando os resultado obtidos em nosso trabalho.

Outros autores também obtiveram resultados semelhantes, como Rueda (2012), que observou redução da reatividade após sucessivas passagens de fêmeas bovinas pelo curral de manejo. Macedo et al. (2011) também observaram redução dos níveis de cortisol em vacas Nelore submetidas a coleta de embrião, resultados atribuídos à aclimatação e adaptação dos bovinos às práticas de manejo e manipulação humana. Resultados similares foram reportados por Grandin (1993) que também observou redução dos níveis de cortisol com o decorrer de rotinas de manejo, demonstrando o efeito da adaptação animal sobre a produção desse importante hormônio relacionado ao estresse. De acordo com Titto et al. (2010), mesmo em condições estressantes como é o caso do agrupamento animal em lotes para confinamento também se pode observar a redução nos níveis de cortisol e de reatividade de bovinos ao longo do período de terminação animal.

Em nosso estudo os touros considerados de temperamento RE apresentaram valores de cortisol superior aos animais de temperamento menos reativo. Resultados semelhantes foram reportados por Carli et al. (2018), que demonstraram que animais mestiços (Angus x Nelore) mais reativos também apresentaram níveis mais elevados de cortisol quando submetidos à regime de confinamento. Outros estudos também demonstraram interação significativa e positiva da reatividade animal com os níveis de cortisol plasmático e com as taxas de fertilidade em bovinos (CURLEY et al., 2008; LOCKWOOD et al., 2016; BRAGA et al., 2018; COOKE et al., 2018). Segundo Macedo et al. (2011), doadoras de embrião da raça Nelore com níveis mais elevados de cortisol podem apresentar menores taxas de recuperação embrionária e, conseqüentemente, pior desempenho reprodutivo.

Embora importantes parâmetros fisiológicos como as frequências cardíaca e respiratória não tenham variado de acordo com o grau de reatividade animal, fisiologicamente se reconhece que o medo e estresse desencadeiam a ativação do sistema nervoso autônomo que culmina com a liberação de catecolaminas, as quais estimulam receptores adrenérgicos que preparam o animal para o reflexo de “fuga” (SAPOLSKY et al., 2000; PUGH et al., 2011).

Em nossa pesquisa foi observada maior velocidade de saída e maior escore de agitação nos animais reativos, resultados que encontraram respaldo em diversos estudos publicados anteriormente que também encontraram correlação entre estresse de manipulação, velocidade de saída do tronco e reatividade animal (GRANDIN, 1993; BURROW; DILLON, 1997; CURLEY et al., 2008; SILVEIRA et al. 2008; VETTERS et al., 2013).

Os resultados da VS observados no presente estudo foram superiores aos reportados por trabalhos anteriores envolvendo bovinos *Bos taurus taurus* (NKRUMAH et al., 2007) e *Bos taurus indicus* como é caso da raça Nelore (FREITAS et al., 2016). Assumpção et al. (2018) observaram que bovinos Nelore com menor interação homem-animal (considerados mais reativos) apresentaram maior velocidade de saída (2,09 m/s) em relação a animais classificados como mais calmos e com maior interação (1,72 m/s), sendo que tais resultados de VS também foram inferiores aos apresentados em nosso estudo. Freitas et al. (2016) também reportaram velocidade média de saída para machos e fêmeas da raça Nelore de 1,1m/s. Da mesma forma, na avaliação da VS para outras raças como é o caso da Charolês (2,61 ms/s), Angus (2,50 m/s) e mesmo para animais cruzados (2,45 m/s) foram reportadas velocidades médias de deslocamento inferiores (NKRUMAH et al., 2007) aos do nosso trabalho.

Tais resultados discrepantes podem ser justificados pela forma e momento em que a VS foi analisada. Na grande maioria dos trabalhos anteriores a avaliação de VS foi utilizada apenas como parâmetro de avaliação comportamental, sem a promoção de um evento estressor prévio. Por outro lado, em nosso estudo as avaliações foram conduzidas após o manejo de curral e exame andrológico empregando eletroejaculação, fatores estressantes que certamente contribuíram para uma velocidade de saída mais elevada. De acordo com Whitlock et al. (2012), a eletroejaculação promove desconforto e aumento das concentrações de cortisol

plasmático, eventos relacionados ao estresse agudo, que justifica o reflexo de fuga do animal, influenciando diretamente a velocidade de saída do tronco de contenção.

Na avaliação de aspectos produtivos foi observado que independente da rotina de avaliação, os animais de temperamento menos reativo apresentaram maior peso corporal quando comparado aos mais reativos. Tais resultados podem ser justificados pelo maior gasto energético dispendido por animais de temperamento mais reativo que, de acordo com Cooke et al. (2009), mobilizam maior quantidade de energia para sustentar esse padrão de temperamento. Voisinet et al. (1997) e Silveira et al. (2008) também observaram associação significativa e negativa entre grau de reatividade animal e ganho de peso.

De acordo com Cooke et al. (2009), em bovinos de temperamento reativo e que vivenciam maiores concentrações séricas de cortisol ocorre maior estímulo para degradação de tecidos corporais, como gordura e musculatura, com o objetivo de gerar energia para ajudar na resposta comportamental, resultando em menor ganho de peso e, portanto, menor performance produtiva. Conclusões semelhantes também foram estabelecidas por Pales et al. (2016) trabalhando com machos não castrados das raças Nelore, cruzamento Nelore x Aberdeen Angus, Caracu x Nelore e Guzerá x Nelore; nesse estudo foi observada correlação negativa entre os níveis de cortisol plasmático e ganho de peso, também demonstrando a interação negativa entre reatividade e desempenho produtivo.

Além das consequências produtivas, níveis elevados do hormônio cortisol tem sido associados a queda no desempenho reprodutivo, como déficits na espermatogênese de diferentes espécies animais (ARCURI, 2015; LOCKWOOD et al. 2016; DAVILLA et al., 2018) e de humanos (HARDY et al., 2005). Entretanto, em nosso estudo não foram observadas interações entre reatividade e concentrações séricas de cortisol com a cinética, morfologia e concentração do ejaculado de touros Nelore. Resultados semelhantes aos do nosso trabalho foram observados por Deishel et al. (2015), que avaliaram o estresse de transporte em garanhões pôneis, sendo observado aumento dos níveis de cortisol associados ao transporte, sem redução em parâmetros relacionados à qualidade espermática.

Trabalhando com touros Angus, Lockwood et al. (2016) também não observaram influência do temperamento sobre a cinética espermática no sêmen *in natura*. Stradaoli et al. (2017) também não observaram correlação entre elevação

dos níveis de cortisol e qualidade seminal de reprodutores das raças Simental e Pardo Suiço.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças entre animais calmos ($1,11 \pm 1,48$ ng/mL) e reativos ($1,31 \pm 1,66$ ng/mL) para os níveis de testosterona, que apresentaram concentrações séricas semelhantes (entre 1,00 e 2,00 ng/mL) às reportadas por estudos anteriores envolvendo touros Zebuínos com idade média de 24 meses (SANTOS et al., 2000). Em contrapartida Hardy et al. (2005) observaram que pacientes humanos sob estresse, vivenciando ambiente endócrino de elevação dos níveis de cortisol, apresentaram queda nas concentrações de testosterona, com consequente prejuízo à espermatogênese e a qualidade do sêmen. Da mesma forma, alterações na secreção de testosterona têm sido associadas a déficits na espermatogênese e qualidade de sêmen em diferentes espécies, como caprinos (TODINI et al., 2007) e humanos (KLIMEK et al., 2005). Em bovinos estudos anteriores demonstraram a interação entre as concentrações séricas de testosterona e a qualidade e fertilidade do sêmen de touros (ANDERSON, 1992; DIAS et al., 2014). Dessa forma, pode-se inferir que em nosso estudo o estresse vivenciado pelos animais mais reativos não foi suficiente para promover a redução nas concentrações séricas de testosterona, o que poderia comprometer a qualidade do sêmen avaliado *in natura*.

Mesmo com advento de novos meios diluidores e dos avanços relacionados a área de criobiologia se reconhece que o processo de criopreservação é responsável pela morte de um número significativo de espermatozoides de um ejaculado (CELEGHINI et al., 2008). Centenas de estudos publicados anteriormente demonstraram a influência de diferentes fontes de variação sobre a qualidade do sêmen bovino criopreservado. No entanto, até o momento não se conhece trabalhos que avaliaram as possíveis interações entre temperamento e qualidade do sêmen de touros Nelore pós-criopreservação.

De maneira geral, espera-se que em um protocolo de criopreservação resulte em pelo menos 50% de espermatozoides móveis após o processamento (ZHANG et al., 1999); entretanto, em ambos os grupos experimentais avaliados a motilidade total pós-descongelação, além de outros parâmetros cinéticos, apresentaram resultados inferiores ao esperado. Embora se reconheça que o processo de criopreservação possa levar a redução significativa na qualidade espermática (WATSON, 2000; CELEGHINI et al., 2008), provavelmente o baixo desempenho de

ambos os grupos experimentais quanto a cinética espermática pós-descongelação se relaciona a falta de seleção prévia dos bovinos para fins de criopreservação espermática.

Não foram observadas diferenças para a integridade de membrana plasmática e acrossomal, demonstrando que reatividade animal não foi capaz de influenciar tais parâmetros estruturais da célula espermática. Estudos anteriores demonstraram influência do estresse e temperamento animal sobre as características físicas e reprodutivas de bovinos de corte (MACEDO et al., 2011; LOCKWOOD et al., 2016; STRADAIOLI et al., 2017), no entanto até o presente momento não se sabe qual o reflexo em características microscópicas ou ultraestruturais, sobretudo de células espermáticas, justificando os resultados encontrados na atual pesquisa.

Nas avaliações bioquímicas de membrana espermática também não foi observada a interação entre reatividade e comportamento animal com o percentual de células peroxidadas e produção de ânion superóxido. Estudos anteriores demonstraram que alguns tipos de condições estressantes como é o caso do estresse térmico (ROCHA et al., 2015), podem interferir nos constituintes do plasma seminal de ruminantes, gerando aumento da produção de EROS (KAO et al., 2008). Porém, de acordo com a metodologia proposta, provavelmente a magnitude de estresse e reatividade animal não foi suficiente para aumentar a produção de lesões oxidativas diretas à membrana dos espermatozoides, justificando os resultados encontrados.

Até o presente, poucos estudos abordaram as possíveis relações entre temperamento, capacidade reprodutiva e avaliação termográfica testicular em touros. Em nossa pesquisa, não foram observadas diferenças na temperatura de globo ocular comparando os grupos avaliados. De acordo com Johnson et al. (2011) a temperatura do globo ocular possui correlação positiva com a temperatura sistêmica; dessa forma é possível concluir que a reatividade animal não exerceu influência sobre a temperatura corpórea dos bovinos avaliados.

Em contrapartida, animais pouco reativos demonstraram tendência ($P < 0,1$) a apresentar temperatura testicular inferior no polo dorsal, área centro-testicular e na cauda do epidídimo quando comparados aos touros reativos, que por sua vez apresentaram maior temperatura no polo caudal da gônada masculina. Tais resultados sugerem que a reatividade animal pode influenciar a capacidade de

termorregulação testicular de bovinos, fator determinante para manutenção da espermatogênese.

Fatores individuais, como raça e genótipo podem influenciar a adaptabilidade do animal ao clima e à temperatura ambiente, de modo em que em situações de temperatura extrema é necessário gasto energético para manutenção da temperatura corporal dentro dos padrões fisiológicos (TEIXEIRA et al., 2019). Nesse contexto, como nosso estudo foi desenvolvido essencialmente durante os meses de primavera no hemisfério Sul, sob condições médias de temperatura que oscilaram entre 28 a 34°C durante às rotinas experimentais, pode-se inferir que animais naturalmente menos reativos foram mais eficientes na manutenção da homeostase e da temperatura testicular, mesmo sob condições ambientais que excederam a zona de termotolerância para animais Zebuínos. Animais de temperamento naturalmente mais calmo dispõem menor gasto energético para manutenção da homeostase quando comparados a animais reativos (COOKE et al., 2009), observações que podem justificar os resultados encontrados.

Na avaliação da ecogenicidade testicular não houve diferença entre os grupos estudados, exceto para a primeira rotina experimental. Provavelmente tais diferenças se devem a variações ou falhas na captação das imagens que ocorreram especificamente nessa rotina. De acordo com Tomlinson et al. 2017, mesmo a ultrassonografia representando um método objetivo de avaliação da saúde testicular, inúmeras fontes de variação podem comprometer a sensibilidade e acurácia do exame quando empregado para avaliação andrológica de touros.

Além disso, não foram observadas correlações entre ecogenicidade testicular e qualidade de sêmen, resultados semelhantes aos reportados anteriormente (ARTHEAGA; BARTH; BRITO, 2005). Nesse contexto, pode-se inferir que a ultrassonografia testicular pode não representar um teste sensível para avaliação de potencial reprodutivo de touros hígidos, provavelmente apresentando maior aplicabilidade e sensibilidade para o diagnóstico de patologias com sede no testículo.

8 CONCLUSÃO

O temperamento dos touros Nelore teve impacto sobre o peso vivo, entretanto não influenciou a concentração sérica de testosterona, a qualidade do sêmen in natura e criopreservado. A elevação do cortisol sérico nos animais reativos influenciou de modo negativo o peso corporal e a capacidade de termorregulação testicular, sem no entanto afetar o potencial reprodutivo no atual estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y; CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, p. 15-23, 2002.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 69-75, 2006.

ANDERSON, M. Relationship between GnRH-induced testosterone maxima, sperm motility and fertility in Ayrshire bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 107-111, 1997.

ARCURI, Grazielle Braidó. **Efeitos do estresse no manejo reprodutivo em cães machos de trabalho militar**. 2015, 58 F. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2015.

ARRUDA, R. P; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinaria**, v. 31, p. 230-231, 2003.

ARTEAGA, A; BARTH, A. D; BRITO, L. F. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 408-415, 2005.

ASSUMPÇÃO, T. I. et al. Reactivity of nelore cows in corral handling and containment chute. **Journal of Agriculture and Life Sciences**, v. 5, p. 53-58, 2018.

BARTH, A. D. 1993. Factors affecting fertility with artificial insemination. **Veterinary Clinic North American Food Animal Practice**, v. 9, p. 275-289, 1993.

BARTH, A. D. **Bull breeding soundness evaluation**. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners. 2002.

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.

BERTOL, M. A. F. et al. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozóides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, v.44, p. 1658-1663, 2014.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Veterinay Medicine**, v. 25, p. 383-339, 1973.

BOISSY, A; BOUISSOU, M. F. Effects of early handling on heifers' subsequent reactivity to humans and to unfamiliar situations. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 20, p. 259-273, 1988.

BOIVIN, X. et al. Influence of breed and early management on ease of handling and open-field behaviour of cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 32, p. 313-323, 1992.

BOND, G. B. et al. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem estar de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1286-1293, 2012.

BOSCARATO, A. G; MARTINS, L. F. Uso de colesterol na criopreservação espermática e fertilidade: uma revisão. **Arquivo Ciência Veterinária Zoológica**, v. 17, p. 143- 148, 2014.

BOZZO, G. et al. Analysis of stress indicators for evaluation of Animal Welfare and Meat Quality in Traditional and Jewish Slaughtering. **Animals**, v. 21, p. 8, 2019.

BRAGA, J. S. et al. Temperament effects on performance and adaptability of Nellore young bulls to the feedlot environment. **Livestock Science**, v. 216, p. 88-93, 2018.

BREEN, K. M. et al. 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 inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? **Endocrinology**, v. 145, p. 692-698, 2004.

BREUER, K; HEMSWORTH, P; COLEMAN, G. J. The effect of positive or negative handling on the behavioural and physiological responses of non lactating heifers. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 84, p. 3-22, 2003.

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

BRITO, L. F. C. et al. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. **Theriogenology**, v. 78, p. 69-76, 2012.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, p. 524-526, 1986.

- BURROW, H. M., DILLON, R. D. Relationships between temperament and growth in a feedlot and commercial carcass traits of *Bos indicus* crossbreds. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 37, p. 407-411, 1997.
- BURROW, H. M; SEIFERT, G. W; CORBET, N. J. A new technique for measuring temperament in cattle. **Australian Society of Animal Production**, v. 17, p. 154-157, 1988.
- 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, Neil. **Fisiologia do comportamento**. 7 ed. Barueri-SP, Manole, 2002.
- CASEY, P. J. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 289-297, 1993.
- 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, Eneiva Carla Carvalho. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2005, 188p.
- CHANDOLIA, R. K. et al. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. **Theriogenology**, v.48, p. 99-117, 1997.
- CHIQUELLI 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.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p
- COOK, N. J. et al. Stress and pain assessment of velvet antler removal from Elk (*Cervus elaphus canadensis*) and Reindeer (*Rangifer tarandus*). **Online Journal of Veterinary Research**, v. 9, p. 13-25, 2005.
- COOKE, R. F. et al. Effects of acclimation to human interaction on performance, temperament, physiological responses, and pregnancy rates of Brahman-crossbred cows. **Journal Animal Science**, v. 87, p. 4125-4132, 2009.
- COOKE, R. F. et al. Effects of temperament and acclimation to handling on reproductive performance of *Bos taurus* beef females. **Journal Animal Science**, v. 90, p. 3547-3555, 2012.

COOKE, R. F. et al. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed-timed AI in *Bos indicus* beef cows. **Livestock Science**, v. 142, p. 108-113, 2011.

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.

COOKE, R.F. et al. Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in *Bos indicus* beef cows. **Journal Animal Science**, v. 95, p. 1-8, 2017.

COSTA E SILVA, E. V; RUSSI, L. S. Ambiência e reprodução de bovinos de corte. In: COSTA E SILVA, E. V. et al. Estratégias para avaliar bem-estar animal em animais em reprodução. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 13, p. 20-28, 2010.

CRESPILHO, A. M. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu - SP, Brasil.

CRESPILHO, A. M. et al. 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.

CURLEY, K. O. et al. Functional characteristics of the bovine hypothalamic-pituitary-adrenal axis vary with temperament. **Hormones and Behavior**, v. 54, p. 20-27, 2008.

CURLEY, K. O. et al. Technical note: Exit velocity as a measure of cattle temperament is repeatable and associated with serum concentration of cortisol in Brahman bulls. **Journal Animal Science**, v. 84, p. 3100-3103, 2006.

DAVILLA, F. S. et al. Social dominance affects the development of sexual behaviour but not semen output in yearling bucks. **Theriogenology**, v. 110, p. 168-174, 2018.

DEICHSEL, K. et al. Increased cortisol release and transport stress do not influence semen quality and testosterone release in pony stallions. **Theriogenology**, v. 84, p. 70-75, 2015.

DIAS, J. C. et al. Níveis periféricos de testosterona total em touros Guzerá. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p. 64-73, 2014.

DOBSON, H; SMITH, R. F. What is stress and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 743-752, 2000.

DURAIRAJANAYAGAM, D; AGARWAL, A; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 30, p. 14-27, 2005.

EDDY, A. L; VANHOOGMOED, L. M; SNYDER, J. R. The role of thermography in the management of equine lameness. **Veterinary of Journal**, v. 162, p. 172-181, 2001.

EDWARDS, L. M; RAHE, C. H; GRIFFIN, J. L. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. **Theriogenology**, v. 28, p. 291-299, 1987,

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

ESKIOCAK, S. S; ESKIOCAK, A. S; GOZEN, S. B. Glutathione and free sulphydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. **Human Reproduction**, v. 20, p. 595-600, 2005.

FORDYCE, G. et al. Temperament and bruising of Bos indicus cross cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 25, p. 283-288, 1985.

FRASER, Andrew. Ferguson. **Comportamiento de los animales de granja**. Editorial Acribia, Zaragoza, 1980.

FREITAS, Anielly de Paula. **Temperamento de bovinos de corte: fatores genéticos e ambientais**. 2016, 86 F. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2016.

FREITAS-DELL'AQUA C. P. et al. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. **Journal of equine Veterinary Science**, v. 66; p. 57, 2018.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P. et al. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 941, 2012.

GABOR, G. et.al. Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein- Friesian breeding bulls. **Animal Reproduction Science**, p. 215-24, 1998.

GHARAGOZLOO, P; AITKEN, R. J. the role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, p. 1628-1640, 2011.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinarian Clinical of North America Equine Practice**, v. 12 p. 119-30, 1996.

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

GRANDIN, T. Behavioural principles of cattle handling under extensive conditions. **Livestock Handling and Transport**, CAB, International Oxon United Kingdom, 1993.

GRAVANCE, C. G. et al. Fluorescent probs and glow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 5-10, 2001.

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.

GUASTI, P. N. et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 17-20, 2012.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e Criopreservação de Gametas e Embriões. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri - SP: Manole, 2004, cap. 30, p. 435-446.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philosophical transactions of the royal society b. **Biological Sciences**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.

HARDY, M. O. et al. Stress hormone and male reproductive function. **Cell and Tissue Research**, v. 32, p. 147-53, 2005.

HARRISON, R. A. P; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990,

HATAMOTO, L. K. et al. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.

JOHNSON S.R. et al. Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 63-66, 2011.

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.

KAO, S. et al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. **Fertil Steril**, v. 89, p. 1183-1190, 2008.

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.

KASTELIC, J. P. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Research** , v. 65, p. 111-115, 2001.

KLEIBER, M. **The Fire of Life**. R.E. Krieger Publishing Company: Huntington, New York. 1975

KLIMEK, M. et al. Levels of plasma ACTH in men from infertile couples. **Neurology Endocrinology Letters**, v. 26, p. 347-350, 2005.

LE CLERC, P; de LAMIRANDE, E; GAGNON, C. Regulation of proteintyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 643-656, 1997.

LEITE, P. A. et al. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científica Ciência Biologia Saúde**, v. 13, p. 279-286, 2011.

LOCKWOOD, S. A. et al. Realtionships among temperament, acute and chronic cortisol and testosterone concentrations, and breeding soundness during performance testing of Angus bulls. **Theriogenology**, v. 89, p. 140-145, 2016.

LUNSTRA, D. D; COULTER, G. H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural mating fertility in beef bulls. **Journal Animal Science**, v. 77, p. 767-774, 1997.

MACEDO, G. G. et al. Human-animal interaction, stress, and embryo production in Bos indicus embryo donors under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 1175-1182, 2011.

MACFARLANE, M. S; BREEN, K.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.

MADEIRA, E.M. et al. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 65, p. 415-420, 2013.

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

MAKAE, T. et al. The effect of exogenous anabolic steroids on growth performance, testicular and seminal characteristics of yearling Boer goat bucks. **Small Ruminant Research**, v.105, p.290-294, 2012.

MATTERI, R. L; CARROLL, J. A; DYER, C. J. Neuroendocrine Responses to Stress. **The Biology of Animal Welfare**, p. 43-76, 2000.

MCGRADY, A .V. Effects of phychological stress onmale reproduction: a review. **Archives of Andrology**, v. 13, p. 1-7, 1984.

MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 204-212, 2007.

MIESEL, R. et al. Severe antioxidase deficiency in human semen samples with pathological spermiogram parameters. **Andrologia**, v. 29, p. 77-83, 1997.

MULLER, Pedro Bernardo. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. 2. ed. Sulina, Porto Alegre, 1982.

NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 225-235, 2004.

NAKAYAMA, K. et al. Decrease in nasal temperature of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) in negative emotional state. **Physiology and Behavior**, v. 84, p. 783-790, 2005.

NKRUMAH, J. D. et al. Genetic and phenotypic relationships of feeding behavior and temperament with performance, feed efficiency, ultrasound, and carcass merit of beef cattle. **Animal Science**, v. 85, p. 2381-2390, 2007.

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

PALES, A. P. et al. Serum cortisol concentration in cattle of different genetic groups slaughtered in confinement. **Ciências Agrárias**, v. 37, p. 2601-2608, 2016.

PAP, E. H. et al. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY (581/591). **Febes Lett**, v. 453, p. 278-282, 1999.

PAPA, F. O. Et al. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. *Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. Anais... In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina - PR, 2008.*

PAPA, P. M. et al. 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. 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.

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180. 1988.

PESCH, S; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

PETERS, M. D. P; BARBOSA SILVEIRA, I. D; PEREIRA, L. M. R. Manejo aversivo em bovinos leiteiros e efeitos no bem-estar, comportamento e aspectos produtivos. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 435-442, 2010.

PETHERICK, J. C. et al. Productivity, carcass and meat quality of lot-fed Bos indicus cross steers grouped according to temperament. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 42, p. 389-398, 2002.

PETHERICK, J. C; HOLROYD, R. G; SWAIN, A. J. Performance of lot-fed Bos indicus steers exposed to aspects of a feedlot environment before lotfeeding. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 43, p. 1181-1191, 2003.

PIERSON, R. A; ADAMS, G. P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bed fellows. **Theriogenology**, v. 43, p. 105-112, 1995.

PIOVENSAN, U. **Análise de fatores genéticos e ambientais na reatividade de quatro raças de bovinos de corte ao manejo**. 1988, 111 F. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Jaboticabal, 1998.

PUGH, K. A; STOOKEY, J. M; BUCHANAN, F. C. An evaluation of corticotropin-releasing hormone and leptin SNPs relative to cattle behaviour. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, p. 567-572, 2011.

PULIDO-RODRÍGUEZ, L. F. et al. Termografia infravermelha da superfície ocular como indicador de estresse em suínos na fase de creche. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 453-458, 2017.

RAMIRES-NETO, C. et al. Study of testicular thermoregulation efficiency installion with different ages. **Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 510, 2012.

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.

ROBERTO, J. V. B; SOUZA, B. B. Fatores ambientais, nutricionais e de manejo e índices de conforto térmico na produção de ruminantes no semiárido. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 6, p. 8-13, 2011.

ROCHA, D.R. et al. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, p. 1291-1305, 2015.

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, Paola Moretti. **Qualidade de manejo e temperamento de bovinos: efeitos na eficiência reprodutiva de fêmeas submetidas a um protocolo de**

inseminação artificial em tempo fixo. 87 F. 2012. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.

SAID, T. M. et al. of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. **Fertil Steril**, v. 83, p. 95-103, 2005.

SANOCKA, D.M; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-18, 2004.

SANTOS, M. D. et al. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 738-744, 2000.

SAPOLSKY, R. M; ROMERO, L. M; MUNK, A. U. How do glucocorticoids influence stress reponses? Integrating permissive, supressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinology Review**, v. 21, p. 55-89, 2000.

SCHAEFER, A. L. et al. The effect of fasting and transportation on beef cattle. 1. Acid-Base electrolyte balance and infrared heat loss of beff cattle. **Livestock production Science**, v. 20, p. 15-24, 1988.

SILVEIRA, I. D. B. et al. Relação entre genótipos e temperamento de novilhos Charolês x Nelore em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1808-1814, 2008.

STEWART, M. et al. Infrared thermography as a non-invasive method for detecting fear-related responses of cattle to handling procedures. **Animal Welfare**, v. 17, p. 387-393, 2008..

STEWART, M. et al. Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 520-525, 2007.

TEIXEIRA, V. A. et al. Reproductive characteristics of bulls from two breed compositions and their correlations with infrared thermography. **Journal of Thermal Biology**, v. 85, 2019.

TITTO, E. A. L. et al. Reactivity of Nellore steers in two feedlot housing systems and its relationship with plasmatic cortisol. **Livestock Science**, v. 129, p. 146-150, 2010.

TODINI, L. et al. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. **Theriogenology**, v. 67, p. 627-631, 2007.

TOMLINSON, M. et al. The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. **Theriogenology**, v. 89, p. 169-177, 2017.

VERBERCKMOES, S.et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 912-922, 2005.

VETTERS, M. D. D. et al. Comparison of flight speed and exit score as measurements of temperament in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 374-81, 2013.

VOISINET, B. D. et al. 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.

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

WEBSTER, A. J. F. Farm animal welfare. The five freedoms and the free market. **The Veterinary Journal**, v. 161, p. 229-237, 2001.

WHITLOCK, B. K. et al. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology**, v. 78, p. 737-46, 2012.

WOLFE, J. e BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

WOŹNIAK, B. et al. Levels of the natural hormones 17 β -oestradiol and testosterone in serum of cattle: results from population studies in Poland. **Journal Veterinary Research**, v. 60, p. 461-466, 2016.

YOSHIDA, C; NAKAO, T. Response of plasma cortisol and progesterone after acth challenge in ovariectomized lactating dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 99-107, 2005.