

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Curso de Medicina Veterinária

Karoline Maria Gil Braz

**INFLUÊNCIA DA BIPARTIÇÃO ESCROTAL SOBRE A CAPACIDADE
DE TERMORREGULAÇÃO E HEMODINÂMICA TESTICULAR EM
CAPRINOS**

São Paulo
2015

Medicina Veterinária
Karoline Maria Gil Braz

**INFLUÊNCIA DA BIPARTIÇÃO ESCROTAL SOBRE A CAPACIDADE
DE TERMORREGULAÇÃO E HEMODINÂMICA TESTICULAR EM
CAPRINOS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da
Universidade de Santo Amaro – UNISA,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Medicina
Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. André Maciel
Crespilho.

São Paulo
2015

Karoline Maria Gil Braz

**INFLUÊNCIA DA BIPARTIÇÃO ESCROTAL SOBRE A CAPACIDADE
DE TERMORREGULAÇÃO E HEMODINÂMICA TESTICULAR EM
CAPRINOS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho

São Paulo, 16 de dezembro de 2015.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr. Rafael Garabet Agopian

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Conceito final: DEZ

Ao Prof. Dr. André Maciel Crespilho, pela orientação, pela confiança, oportunidade, paciência, amizade, pelo conhecimento cedido e por ter me dado a honra de trabalhar com ele.

A UNISA que me apoiou com a bolsa de iniciação científica (12/2014) e me permitiu realizar a pesquisa.

A Prof. Dr. Carolina Ghirelli por ter realizado a ultrassonografia Doppler dos animais do projeto.

Ao mestrando Cristiano Ferreira por seu auxílio com a interpretação das punções biópsias aspirativas testiculares e ao Carlos Ramires Neto pelo auxílio na execução dos exames termográficos.

A Karinne Ávila, Daniele Campos e a Nicole Flavio pela ajuda em todas as etapas de execução do projeto.

A minha amiga Julia Leati que me deu apoio e sempre me incentivou.

A minha família, em especial a minha Mãe, que me incentivou, me apoiou e me deu a oportunidade de estar aqui

.

A DEUS, QUE ME DEU A VIDA, QUE ME LEVANTOU TODOS OS DIAS, QUE RENOVOU MINHAS FORÇAS À CADA MANHÃ, E QUE ESTÁ REALIZANDO MAIS UM SONHO MEU.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da bipartição escrotal sobre a capacidade de termorregulação do testículo de caprinos, testando-se a hipótese de que animais com bipartição possuem menor temperatura testicular, maior capacidade hemodinâmica local, maior número de células germinativas primordiais e, portanto, maior capacidade de produção espermática. Para o estudo foram selecionados 8 bodes que foram divididos de acordo com a conformação dos testículos: G1 (n=4) animais com pelo menos 25 % de bipartição escrotal; GC (n=4) grupo controle, sem bipartição escrotal. Todos os animais foram submetidos em triplicata à termografia escrotal e da superfície corporal (InfraCam®, Boston, USA), avaliação da temperatura retal, ultrassonografia Doppler (Aloka® SSD 2200) realizada na região do plexo pampiniforme, considerando-se os parâmetros velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF), velocidade média (VM), índice de resistência (IR; $IR = \frac{VPS - VDF}{VPS}$) e índice de pulsatilidade (IP; $IP = \frac{VPS - VDF}{VM}$). Adicionalmente, os animais foram submetidos à punção biópsia aspirativa (PBA) do testículo direito e 2 ejaculados de cada reprodutor foram coletados. Os dados gerados foram submetidos à análise de variância através de modelo linear geral (GLIMMIX, SAS Institute Inc, Cary, USA). Não foram observadas diferenças para os resultados da PBA e da termografia testicular comparando-se os dois grupos experimentais. Em ambos os grupos, a temperatura retal foi superior a temperatura de superfície corporal, que foi maior que a temperatura da superfície escrotal. Na avaliação hemodinâmica apenas o IR e o VPS foram superiores para os animais bipartidos em relação ao controle. Apesar de estudos anteriores indicarem uma possível relação entre a bipartição escrotal e a eficiência no processo de termorregulação, foi verificado que animais com bipartição escrotal inferior a 50% não apresentaram temperatura de superfície escrotal inferior ao grupo controle, resultados que rejeitam a hipótese inicial. Embora pesquisas anteriores conduzidas nas espécies equina e canina tenham associado maiores índices de IR e VPS com maior resistência hemodinâmica local e, conseqüentemente, com queda na qualidade espermática, estudos recentes envolvendo a avaliação testicular Doppler em ruminantes apontaram correlação positiva para VPS e VDF com o potencial de fertilidade espermática. Estudos conduzidos na espécie caprina demonstraram maior comprimento do funículo espermático e da artéria testicular de bodes bipartidos em relação a reprodutores sem bipartição, resultados que podem justificar o aumento da velocidade de pico sistólico e da resistência vascular nesse grupo de animais.

Palavras-chave: Bipartição, Doppler, Termografia, Testículo, Caprinos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the scrotum splitting on the thermoregulatory capacity of the goat testicle, testing the hypothesis that animals with splitting are less testicular temperature, greater local hemodynamic capacity, more primordial germ cells, therefore, higher sperm production capacity. For the study were selected 8 goats were divided according to the conformation of the testicles: G1 (n = 4) animals with scrotal splitting below 50%; GC (n = 4) control group without scrotal splitting. All animals were submitted in triplicate to the scrotal thermography and body surface area (InfraCam®, Boston, USA), evaluation of rectal temperature, Doppler ultrasonography (Aloka® SSD 2200) held at the spermatic cord region of each testicle, considering the parameters peak systolic velocity (PSV), end-diastolic velocity (EDV), mean velocity (MV), resistance index (RI; $IR = \frac{VPS-VDF}{VPS}$) and pulsatility index (PI; $IP = \frac{VPS-VDF}{VM}$). In addition, the animals underwent punch biopsy aspiration (PBA) of the right testicle and two ejaculates from each player were collected. The data generated were subjected to analysis of variance using the general linear model (GLIMMIX, SAS Institute Inc, Cary, USA). Differences to the results of the PBA and testicular thermography comparing the two groups were observed. In both groups, the rectal temperature was greater than body surface temperature, which was higher than the surface temperature of the scrotum. In hemodynamic only the IR and VPS were higher for the split in the control animals. Although previous studies indicate a possible relationship between scrotal splitting and efficient thermoregulation process, it was found that animals with scrotal splitting below 50% did not have scrotal surface temperature lower than the control group, results that reject the initial hypothesis. Although previous research conducted in equine and canine have associated higher IR indexes and VPS more local hemodynamics resistance and hence a decline in sperm quality, recent studies involving the Doppler testicular reviewed in ruminants showed positive correlation for VPS and VDF with potential sperm fertility. Previous studies conducted in goats showed greater length of the spermatic cord and testicular artery goats split in relation to players without splitting, results that can justify an increase in peak systolic velocity and vascular resistance in this group of animals.

Keywords: splitting, Doppler, thermography, Testis, Goats.

Lista de Figuras

- Figura-1** Morfologia da bolsa testicular: figura A representando um caprino com escroto bipartido (G1), e B sem bipartição escrotal (CG).....18
- Figura-2** Exame termográfico do testículo de caprino: figura A representando a TSE de um animal bipartido (G1) e B de um não bipartido (GC).....19
- Figura-3** Ultrassonografia Doppler. Avaliação da Velocidade de Pico Sistólico (VPS= 11,8 cm/s; seta vermelha) e da Velocidade Diastólica Final (VDF= 5,3 cm/s, seta azul) na região do cordão espermático. Ambos os valores foram utilizados para os cálculos dos índices de resistência (IR) e de pulsatilidade (IP).....20
- Figura-4** Esfregaços obtidos a partir da PBA testicular e coloração GIENSA. Em 1: espermatogônia (seta vermelha) e espermatíde final (seta azul); 2: espermatíde final (seta azul) e espermatócito (seta amarela); 3: espermatogônias (seta vermelha); 4: espermatócito (seta amarela) e células de Sertoli (seta verde)..... 21

Lista de Tabelas

Tabela-1 Resultados médios da TSE (temperatura da superfície escrotal) e da TSC (temperatura de superfície corporal) avaliados através de termografia, e TR (temperatura retal) aferida com auxílio de termômetro digital, de acordo com cada grupo experimental.....23

Tabela-2 Resultados médios do VDF (velocidade diastólica final), VPS (velocidade de pico sistólico), IR (índice de resistência) e IP (índice de pulsatilidade) encontrados na ultrassonografia Doppler do funículo espermático. O G1 representa os animais com bipartição e o GC sem bipartição.....24

Tabela-3 Percentual médio de células germinativas e células de Sertoli encontradas no G1 (bipartidos) e no GC (sem bipartição) à partir da realização de punções biópsias aspirativas testiculares.....25

Lista de Gráficos

Gráfico-1 Índice de resistência	24
Gráfico-2 Índice de pulsatilidade	25

Lista de Abreviaturas

G1	Grupo com bipartição escrotal
GC	Grupo controle sem bipartição escrotal
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistência
PBA	Punção biópsia aspirativa
ROS	Radicais livres de oxigênio
TR	Temperatura retal
TSC	Temperatura de superfície corporal
TSE	Temperatura de superfície escrotal
VDF	Velocidade diastólica final
VPS	Velocidade de pico sistólico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais E Grupos Experimentais	17
3.2 Biometria E Termografia Testicular	18
3.3 Ultrassonografia Doppler Testicular	19
3.4 Avaliação Da Espermatogênese: PBA	20
3.5 Avaliações Espermáticas	21
3.6 Análise Estatística	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de se reproduzir representa o indício mais contundente da adaptação animal a um determinado ambiente. Diferente dos demais compartimentos orgânicos, os testículos dos machos de diferentes espécies animais possuem mecanismos próprios de adaptação que atuam não apenas em situações de variação ambiental, como também, são imprescindíveis para garantir menores temperaturas intratesticulares em relação à temperatura corpórea⁽¹⁾.

A localização dos testículos dentro do escroto é essencial para a espermatogênese, visto que no escroto a temperatura local é de 2 a 6 graus inferior a temperatura do abdômen^(2,3).

Nas regiões áridas e semi-áridas no Leste da África são encontrados caprinos que apresentam divisão da bolsa testicular⁽⁴⁾. Nunes et al.⁽⁵⁾ relataram a ocorrência dessa mesma característica em caprinos criados no Nordeste do Brasil e, segundo os autores, essa morfologia diferenciada permitiria uma maior exposição ambiental dos testículos, facilitando a troca de temperatura por maior perda de calor e, conseqüente, maior eficiência reprodutiva.

Como poucos estudos disponíveis na literatura avaliaram de forma objetiva a termorregulação de animais com bipartição escrotal, essa pesquisa teve como objetivo comparar diferentes aspectos relacionados a temperatura, vascularização e qualidade seminal entre caprinos portadores ou não de escroto bipartido, testando a hipótese de que animais com bipartição possuem menor temperatura testicular e maior capacidade hemodinâmica local, maior número de células germinativas primordiais e portanto maior capacidade de produção espermática em caprinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Diversos mecanismos anatomo-fisiológicos atuam em conjunto para garantir uma termorregulação eficiente. A pele do escroto é naturalmente fina, apresentando pouca cobertura pilosa e dotada de numerosos vasos sanguíneos subcutâneos que promovem a troca de calor passiva com o ambiente, resultando em queda da temperatura local⁽⁶⁾. Além disso, o escroto dos animais domésticos apresenta um grande número de glândulas sudoríparas que através da transpiração também permitem o controle da temperatura testicular⁽⁷⁾. Fourie et al.⁽⁸⁾ constataram a importância das glândulas sudoríparas e da espessura cutânea do escroto para o processo de termorregulação. De acordo com os autores, o manejo nutricional intensivo de carneiros jovens, sujeitos a dietas ricas em concentrado, pode exercer efeito deletério sobre a qualidade espermática em virtude do espessamento e acúmulo de gordura escrotal que pode interferir diretamente na capacidade de termorregulação e espermatogênese dos reprodutores. De acordo com Nunes et al.⁽⁹⁾, as glândulas sudoríparas presentes no escroto podem produzir até cinco vezes mais suor em relação a glândulas presentes em outras áreas cutâneas demonstrando, portanto, o papel de destaque da transpiração para a promoção da termorregulação testicular.

Dentre as adaptações anatômicas relacionadas ao mecanismo termorregulatório destaca-se a relação existente entre a artéria testicular e as veias testiculares, sistema vascular que compõe o plexo pampiniforme. De acordo com Senger et al.⁽¹⁰⁾, em virtude do enovelamento dos ramos venosos sobre a artéria testicular ocorre um eficiente mecanismo de troca de calor passiva por contracorrente, havendo a refrigeração do sangue da artéria que chega aos testículos a partir da aorta abdominal em função do contato estabelecido com a parede dos vasos que carregam o sangue das veias. A queda de temperatura do sangue das artérias no seu percurso até o testículo começa a ocorrer a partir do anel inguinal interno, enquanto que a temperatura sanguínea nas veias aumenta progressivamente do polo caudal dos testículos, no sentido do anel inguinal externo⁽¹¹⁾.

De acordo com Kastelic⁽¹²⁾, outro importante mecanismo termorregulatório representa a inervação por neurônios simpáticos pós-ganglionares que se originam na coluna lombar sobre a musculatura lisa que envolve as arteríolas presentes no escroto. Dessa forma, em situações onde se observa o aumento da temperatura testicular ocorre de maneira reflexa a dilatação dessas arteríolas pela ação direta do calor, liberando o reflexo simpático vasoconstritor.

Outra adaptação frequentemente relacionada com o fenômeno de termorregulação testicular representa a conformação bipartida dos testículos, condição frequentemente encontrada em ruminantes criados em regiões tropicais⁽⁴⁾.

A bipartição escrotal foi descrita pela primeira vez em caprinos na África Oriental por Robertshaw⁽⁴⁾ e, mais tarde, em animais no Nordeste do Brasil por Nunes et al.⁽⁵⁾. Este recurso de bipartição aumenta a superfície do escroto em contato com o meio ambiente, aumentando a capacidade de dissipação de calor, o que pode contribuir para a melhoria de algumas variáveis reprodutivas, tais como, a biometria testicular⁽¹³⁾ e a qualidade do sêmen^(5,14,15) quando comparado com os animais que não possuem o escroto bipartido.

Almeida et al.⁽¹⁶⁾ observaram que em caprinos com escroto bipartido o número de ramos de artérias na região de bipartição foi maior do que na região da rafe escrotal de caprinos sem bipartição escrotal. Nunes et al.⁽⁹⁾ identificaram que o número de glândulas sudoríparas na pele do escroto e o comprimento da artéria testicular contidos no cordão espermático foram maiores em caprinos com bipartição escrotal. Esses aspectos foram diretamente associados com a capacidade de dissipação de calor local, adaptação que garante uma adequada termorregulação testicular para a ocorrência da espermatogênese⁽¹⁷⁾.

Uma das principais consequências do aumento de temperatura local representam as alterações no fornecimento sanguíneo testicular e aumento do metabolismo celular, situações que associadas levam ao aumento do consumo de oxigênio. A baixa concentração de oxigênio testicular leva a grande produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e a morte das células espermatogênicas, desencadeando o processo de degeneração testicular⁽¹⁸⁾.

Com a produção de ROS pode ocorrer peroxidação dos lipídeos de membrana espermática, fenômeno que não apenas deprime a motilidade 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⁽¹⁹⁾. A suscetibilidade do DNA do espermatozoide em temperaturas elevadas e/ou em locais de termorregulação prejudicada também tem sido bem documentada em estudos conduzidos com animais de laboratório ou animais de interesse zootécnico⁽²⁰⁾. De acordo com Waterhouse et al.⁽²¹⁾ falhas na integridade do DNA espermático representam causas importantes de queda de fertilidade do sêmen bovino.

De acordo com Medeiros e Vieira⁽²²⁾, o ambiente exerce marcada influência sobre a vida reprodutiva, com efeitos evidentes que resultam muitas vezes na redução da eficiência reprodutiva. O efeito de altas temperaturas pode provocar a degeneração do epitélio germinativo, redução da produção de sêmen, queda na fertilidade e, em situações extremas, a esterilidade de machos domésticos. A degeneração testicular pode levar a alterações na espermatogênese e esteroidogênese associadas à azoospermia, aumento na taxa de mutações e alterações na formação dos gametas^(23,24).

O aumento da temperatura testicular pode causar danos na espermatogênese⁽²⁵⁾, onde se verifica um aumento na proporção de células de Sertolli/células germinativas, além da presença de células multinucleadas⁽²⁶⁾.

Setchell⁽²⁵⁾, Santos e Simplicio⁽²⁷⁾ também demonstraram que a elevação da temperatura pode resultar em degeneração testicular, redução da motilidade e da concentração dos espermatozoides, aumento de patologias espermáticas e alterações do plasma seminal, sendo que a extensão desses defeitos é proporcional ao tempo de exposição e a intensidade da temperatura.

Uma das maneiras de se estudar o impacto da elevação de temperatura testicular sobre a produção espermática e espermatogênese representa a análise citológica a partir de punção biópsia aspirativa (PBA) testicular, recurso que permite a obtenção do material diretamente do testículo, sem a necessidade de coleta do sêmen⁽²⁸⁾. A punção biópsia aspirativa por agulha fina representa a técnica de eleição quando comparada a opções mais invasivas como uma biópsia tradicional,

por exemplo, e tem se mostrado uma técnica simples, de baixo custo e de grande contribuição para obtenção de informações precisas sem a ocorrência de sequelas indesejáveis^(29,30).

Outra técnica importante e que tem contribuído para o melhor entendimento do processo de termorregulação representa o uso da termografia testicular. À partir de meados dos anos de 1990, a termografia infravermelha foi proposta como ferramenta de apoio na avaliação andrológica de touros⁽³¹⁾. De acordo com Lunstra e Coulter⁽³²⁾, touros com padrões anormais de temperatura escrotal apresentam menor percentual de espermatozoides com morfologia normal de cabeça, cauda e do acrossoma, além de maior percentual de gotas proximais quando comparados a animais com padrão termográfico normal. De acordo com os mesmo autores, touros com padrões anormais de temperatura alcançam taxas de concepção significativamente inferiores aos animais normais, achados que permitem concluir que a termografia infravermelha pode ser utilizada como ferramenta de seleção de reprodutores. De acordo com Gabor et al.⁽³³⁾, a termografia infravermelha representa uma técnica útil para prever o número e a porcentagem de espermatozoides viáveis em uma amostra de sêmen representando, portanto, uma valiosa ferramenta para avaliação andrológica de ruminantes.

Kastelic⁽³¹⁾ estudou os efeitos de diferentes fatores ambientais na sensibilidade da avaliação termográfica do testículo de bovinos. Apesar do ritmo diurno de pastejo, nenhuma alteração significativa foi encontrada na superfície escrotal em diferentes períodos do dia, resultados que permitem a realização da termografia sem restrições de horários. Já a alimentação influenciou os resultados da termografia. De acordo com o mesmo estudo, 30 minutos após o início da alimentação pode ser observado o aumento da temperatura escrotal que pode durar várias horas. Ainda, em condições de variações na temperatura ambiente ou realização dos exames em áreas de piso frio (tapetes de borracha e grades metálicas) pode ocorrer a redução da temperatura escrotal. Em particular, uma mudança abrupta na temperatura ambiente conduz a uma resposta compensatória aparente após 3 horas do evento inicial, seguida por um retorno lento à temperatura normal após 23 horas. Outro fator importante representa a umidade, que também leva à redução da temperatura local e são necessários pelo menos 30 minutos após

a completa secagem dos testículos para que a temperatura retorne aos seus valores normais.

Outro método indicado para avaliação da termorregulação testicular é a ultrassonografia Doppler, recurso muito utilizado na medicina humana e que vem alcançando a medicina veterinária, tanto para o diagnóstico de gestação quanto para o diagnóstico de doenças das regiões abdominal, pélvica e do sistema reprodutor de machos e fêmeas⁽³⁴⁾. Através da ultrassonografia, a ecotextura e estruturas adjacentes aos testículos podem ser avaliadas para a detecção de alterações patológicas⁽³⁵⁾. Além disso, o Doppler bidimensional associado ao doppler pulsátil trás informações sobre a vascularização testicular, incluindo a posição anatômica dos vasos e informações sobre o fluxo sanguíneo testicular como direção e velocidade, mostrando-se, portanto, um método de grande importância para avaliação dos mais diversos órgãos, incluindo os testículos^(36,37).

Os parâmetros avaliados pela ultrassonografia Doppler são importante para avaliar o fluxo sanguíneo testicular, sendo observados as seguintes variáveis: velocidade diastólica final (VDF), velocidade de pico sistólico (VPS), índice de resistência (IR; $IR = \frac{VPS - VDF}{VPS}$) e índice de pulsatilidade (IP; $IP = \frac{VPS - VDF}{VM}$), onde M representa a média entre VPS e VDF. Alterações testiculares podem levar ao aumento desses valores e conseqüente alterações espermáticas⁽³⁸⁾. Por sua importância como ferramenta diagnóstica, a ultrassonografia Doppler vem sendo utilizada na avaliação reprodutiva de equinos⁽³⁶⁾, cães^(39,40), búfalos⁽⁴¹⁾, camelídeos⁽⁴²⁾ e em ovinos⁽⁴³⁾.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida de forma multicêntrica junto ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade de Santo Amaro (UNISA) Campus I, São Paulo, SP, a empresa privada Vetsemen® situada na Rua Capricórnio 64, Alphaville Conde I, Barueri, SP e a FMVZ-UNESP, Botucatu, SP.

3.1 Animais e Grupos Experimentais

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA - UNISA, São Paulo, Brasil; parecer nº 12/2014). Foram utilizados 8 bodes adultos da raça Anglo Nubiana com idade entre 1,5 e 3 anos. Todos os animais foram alojados em baias coletivas da Mini Fazenda Escola – UNISA, tendo livre acesso a fonte de água e alimento oferecido em cochos coletivos. Durante a fase inicial de triagem todos os animais foram submetidos a exame clínico para constatação do estado geral de saúde.

Os animais foram identificados através da colocação de brincos auriculares e divididos em 2 grupos experimentais de acordo com a conformação dos testículos/escroto: G1 (n=4) bodes com bipartição escrotal inferior a 50% ; GC (n=4) grupo controle, com escroto sem bipartição.



Figura-1: Morfologia da bolsa testicular: figura A representando um caprino com escroto bipartido (G1), e B sem bipartição escrotal (GC).

Fonte: o autor, 2015.

3.2 Biometria e Termografia Testicular

Todos os animais foram submetidos à avaliação de circunferência escrotal através de mensuração direta realizada com fita testicular. Adicionalmente, foi realizada a avaliação termográfica escrotal utilizando-se o sistema InfraCam® (Flir Systems Inc., Boston, MA, USA), de acordo com Ramires Neto et al.⁽⁴⁴⁾. A câmera de infravermelho foi posicionada cerca 1,0 metro de cada testículo, mantendo-se os animais em estação e contidos por cabresto. Cada imagem foi armazenada para análise através do software Therma CAM QuickReport® (Boston, MA, USA). Como parâmetros de avaliação da capacidade de termorregulação foi considerada a centro de cada testículo avaliado individualmente. O valor da temperatura da superfície escrotal foi correlacionado com a temperatura corporal mensurada também através da termografia, e com a temperatura retal avaliada através de termômetro digital.

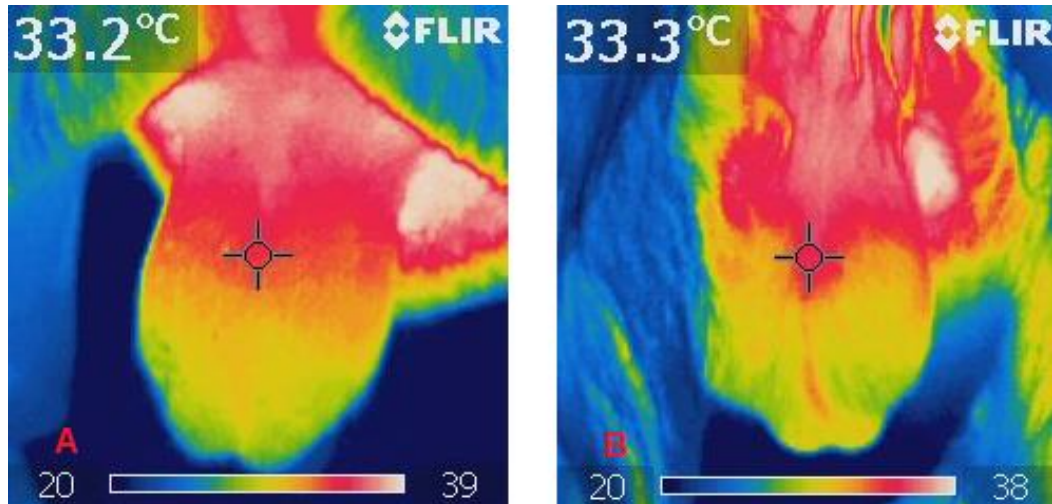


Figura-2: Exame termográfico do testículo de caprino: figura A representando a TSE de um animais bipartido (G1) e B de um não bipartido (GC).

Fonte: o autor, 2015.

3.3 Ultrassonografia Doppler Testicular

A ultrassonografia Doppler (Aloka® SSD 2200 2011, Nagoya, Japão) foi realizada em triplicata na região do cordão espermático de cada testículo. Para isso não foi necessária a tricotomia, apenas a aplicação local de gel ultrassonográfico. Com o animal contido e em estação, um transdutor convexo de 5,0 MHz foi posicionado caudalmente na região central do plexo pampiniforme. A avaliação no modo B dos testículos foi utilizada para análise da ecogenicidade e arquitetura. De acordo com o recomendado por Schurich et. al ⁽³⁸⁾ o modo Doppler colorido pulsado foi utilizado para determinar a velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF), velocidade média (VM), índice de resistência (IR; $IR = \frac{VPS - VDF}{VPS}$) e índice de pulsatilidade (IP; $IP = \frac{VPS - VDF}{VM}$), onde M representa a média entre VPS e VDF (Figura-3).

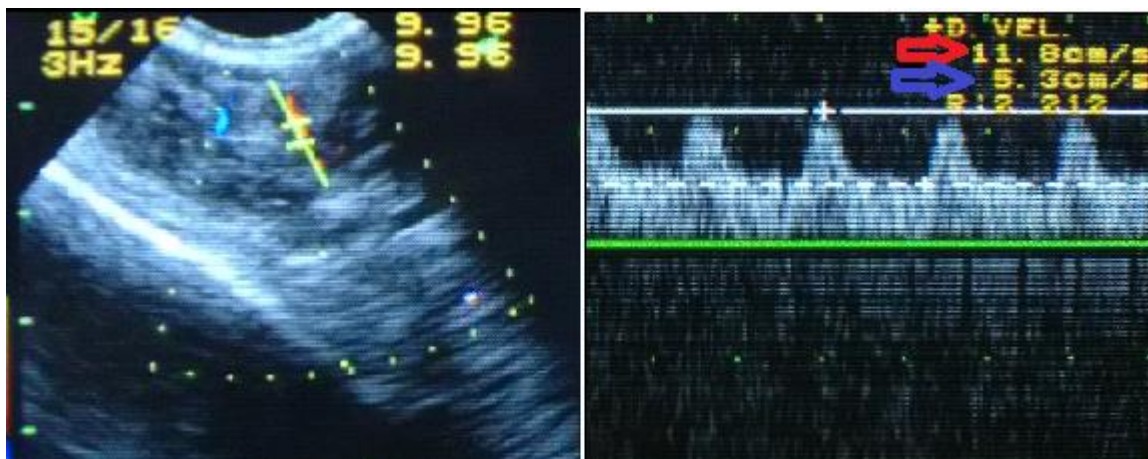


Figura-3: Ultrassonografia Doppler. Avaliação da Velocidade de Pico Sistólico (VPS= 11,8 cm/s; seta vermelha) e da Velocidade Diastólica Final (VDF= 5,3 cm/s, seta azul) na região do cordão espermático. Ambos os valores foram utilizados para os cálculos dos índices de resistência (IR) e de pulsatilidade (IP).

Fonte: o autor, 2015.

3.4 Avaliação da Espermatogênese: Punção Biópsia Aspirativa (PBA)

Após a antissepsia da bolsa testicular que foi realizada pela aplicação de iodo povidine (Riodeíne®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) foram conduzidas as PBAs, realizadas sempre no testículo direito de cada reprodutor, através da introdução de agulhas 25x7 acopladas a seringas descartáveis de 10 mL, perpendicularmente ao parênquima testicular de cada animal, segundo Leme e Papa⁽³⁰⁾.

O conteúdo aspirado dos testículos foi utilizado para confecção de esfregaços em lâminas foscas de vidro que posteriormente foram coradas com Giensa, segundo Papa e Leme⁽²⁶⁾ para avaliação em microscopia de luz. Cada amostra foi avaliada em duplicata onde foram contadas e classificadas de forma consecutivas 200 células de linhagem espermatogênicas, incluindo: espermatogônias, espermatócitos primários, secundários, espermátides iniciais, espermátides finais (células na fase de alongamento durante a espermiogênese), espermatozoides e células de Sertoli (Figura-4).

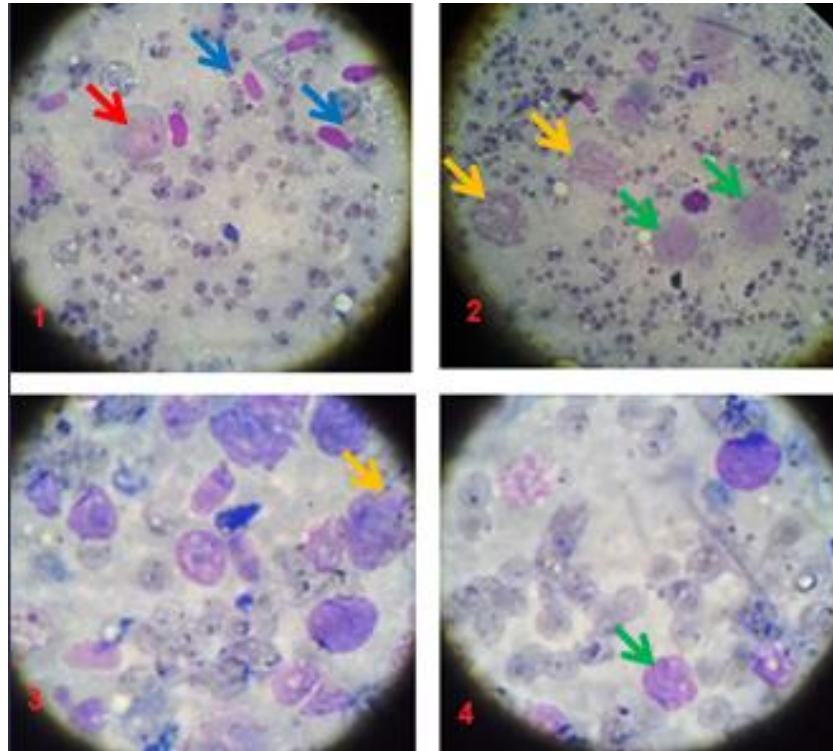


Figura-4: Esfregaços obtidos a partir da PBA testicular e coloração GIENSA. Em 1: espermatogônia (seta vermelha) e espermatíde final (seta azul); 2: espermatíde final (seta azul) e espermatócito (seta amarela); 3: espermatogônias (seta vermelha); 4: espermatócito (seta amarela) e células de Sertoli (seta verde).

(Fonte: o autor, 2015)

3.5 Avaliações Espermáticas

Todos os animais foram submetidos à colheita de sêmen em duplicata (n=16 amostras) através de vagina artificial própria para a espécie. As amostras espermáticas foram avaliadas subjetivamente no ato da colheita quanto à motilidade total e vigor espermático em lâmina e lamínula sob microscopia de luz. Alíquotas de 50ul de sêmen foram diluídas em 950 ul de água destilada para posterior avaliação da concentração espermática através de análise computadorizada (CASA) utilizando o sistema ISAS V.1.2 (Valência, Espanha). Todas as avaliações computadorizadas foram conduzidas na empresa VetSemen, Barueri, SP.

Para avaliação da morfologia espermática foram retiradas alíquotas de 50 μ l do sêmen *in natura* que foram diluídas em solução de formol salino tamponado em PBS a 2% para avaliação morfológica em microscopia de contraste de fase, de acordo com Barth e OKO⁽⁴⁵⁾. Os defeitos foram classificados em menores e maiores.

3.6 Análise Estatística

Foram incluídas no modelo estatístico as variáveis explanatórias representadas pela presença ou não de bipartição testicular, efeito do reprodutor e suas interações. As variáveis dependentes (parâmetros de qualidade espermática, resultados da punção biópsia aspirativa, termografia escrotal, temperatura retal e temperatura de superfície corporal, e a ultrassonografia doppler) foram analisadas através de modelo linear geral (GLIMMIX, SAS Institute Inc, Cary, USA). Cada variável foi testada quanto à normalidade e homogeneidade e as variáveis que não se enquadraram nesse critério foram transformadas em \log_{10} previamente à análise estatística. Adicionalmente, a temperatura da superfície escrotal, temperatura retal e temperatura testicular foram correlacionadas através de teste de correlação de Pearson. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$. Correlações foram consideradas como de baixa intensidade quando inferiores a 0,50, média intensidade entre 0,51 a 0,75 e de alta intensidade acima de 0,76.

4 RESULTADOS

Todos os animais apresentaram volume de ejaculado entre 0,7 e 1,5 ml, motilidade entre 60 e 80% (escala de 0 a 100%), e vigor entre 3 e 5 (escala de 0 a 5). O aspecto variou entre aquoso e cremoso e a concentração entre $4,3 \times 10^9$ e $5,7 \times 10^9$ espermatozoides, não havendo diferenças para nenhuma dessas variáveis quando comparados os dois grupos experimentais.

Na avaliação termográfica não foi observada diferença na temperatura testicular dos animais do G1 em relação ao GC ($32,61 \pm 0,59^a$ e $32,19 \pm 0,65^b$, respectivamente; $p=0,7679$). Foi observado correlação negativa entre a temperatura retal e a temperatura de superfície escrotal ($r=-0,08$; $p>0,05$). Correlação negativa e de baixa intensidade foi observada também entre a temperatura de superfície escrotal e a temperatura de superfície corpórea ($r=-0,4$; $p>0,05$), de acordo com a Tabela-1.

Tabela-1: Resultados médios da TSE (temperatura da superfície escrotal) e da TSC (temperatura de superfície corporal) avaliados através de termografia, e da TR (temperatura retal) aferida com auxílio de termômetro digital, de acordo com cada grupo experimental.

Parâmetros	G1	GC
TSE (°C)	$32,61^a \pm 0,59$	$32,19^a \pm 0,65$
TR (°C)	$39,55^a \pm 0,44$	$39,27^a \pm 0,22$
TSC (°C)	$35,40^a \pm 1,02$	$35,17^a \pm 1,29$

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p<0,05$). Onde, G1: animais com bipartição do escroto; GC: grupo controle sem bipartição.

Fonte: o autor, 2015.

Na avaliação hemodinâmica realizada pela ultrassonografia Doppler foi verificado que o valor médio de VDF não diferiu entre G1 e GC ($7,26 \pm 1,29^a$ e $8,24^a \pm 1,75$, respectivamente; $p=0,1315$), tal como o IP ($0,89 \pm 0,24^a$ para o G1 e $0,80 \pm 0,32^a$ para o GC; $p=0,6287$). No entanto, o IR foi superior para os animais bipartidos em relação ao GC ($0,53 \pm 0,11^a$ e $0,46^b \pm 0,06$, respectivamente; $p=0,0108$),

resultados semelhantes aos observados para a VPS ($15,80 \pm 2,60^a$ e $15,20 \pm 1,88^b$, respectivamente para G1 e GC; $p=0,0140$), de acordo com a Tabela-2.

Tabela-2: Resultados médios do VDF (velocidade diastólica final), VPS(velocidade de pico sistólico), IR (índice de resistência) e IP (índice de pulsatilidade) encontrados na US Doppler do funículo espermático. O G1 representa os animais com bipartição e o GC sem bipartição.

Parâmetros	G1	GC
VDF (cm/s)	$7,26^a \pm 1,29$	$8,24^a \pm 1,75$
VPS (cm/s)	$15,80^a \pm 2,60$	$15,20^b \pm 1,88$
IR	$0,53^a \pm 0,11$	$0,46^b \pm 0,06$
IP	$0,89^a \pm 0,24$	$0,80^a \pm 0,32$

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ($p < 0,05$). Onde, G1: animais com bipartição do escroto; GC: grupo controle sem bipartição.

Fonte: o autor, 2015.

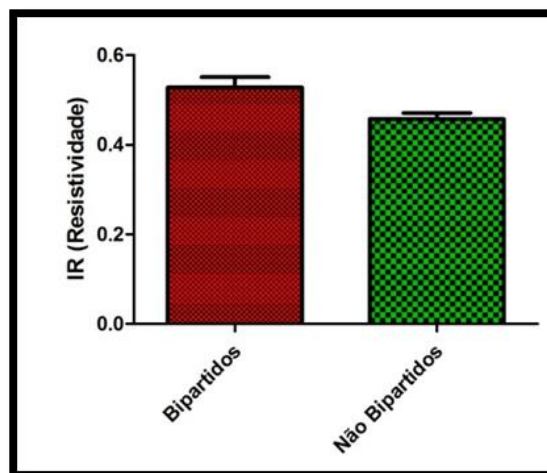


Gráfico-1 Índice médio de resistência comparando animais bipartidos ($p < 0,05$).

Fonte: o autor, 2015.

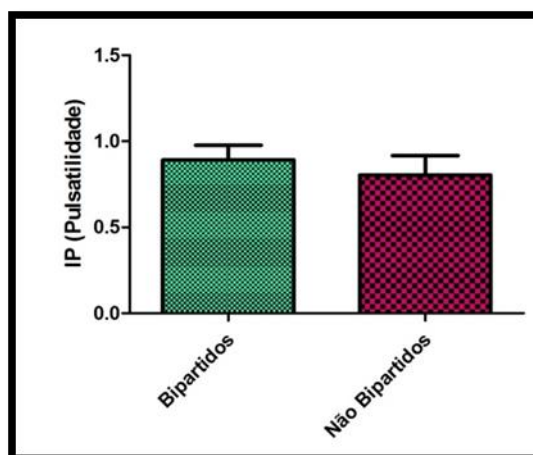


Gráfico-2 Índice médio de pulsatilidade comparando bodes com ou sem bipartição do escroto ($p>0,05$).

Fonte: o autor, 2015.

Nas punções biópsias aspirativas foram identificadas todas as gerações de células germinativas. As Células de Leydig e células degeneradas não foram classificadas. Foram encontradas raras células multinucleadas nas PBAs. Não houve diferença significativa para nenhuma das células de linhagem germinativa quando comparados o G1 em relação ao GC (Tabela-3).

Tabela-3: Percentual médio de células germinativas e células de Sertoli encontradas no G1 (bipartidos) e GC (sem bipartição) a partir da realização de punções biópsias aspirativas testiculares.

Tipo celular	G1	GC
Espermatogônias (%)	9,56 ^a ±2,44	9,69 ^a ±2,15
Espermatócitos I (%)	24,60 ^a ±4,95	19,88 ^a ±5,00
Espermatócitos II (%)	1,13 ^a ±1,15	0,31 ^a ±0,59
Espermátides Iniciais (%)	2,88 ^a ±0,44	2,56 ^a ±0,77
Espermátides Finais (%)	48,81 ^a ±8,51	54,38 ^a ±4,62
Espermatozoides (%)	0,31 ^a ±0,59	0 ^a ±0
Células de Sertoli (%)	13,35 ^a ±3,26	14,50 ^a ±2,59

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

Fonte: o autor, 2015.

5 DISCUSSÃO

Os animais de ambos os grupos estudados apresentaram volume de ejaculado que variou entre 0,5 e 1 ml, resultados semelhantes aos descritos por Hafez e Hafez⁽⁴⁶⁾, que relataram que caprinos apresentam volume ejaculado entre 0,2 e 2,0 mL. Ainda, segundo os mesmos autores, caprinos apresentam a concentração espermática variando de 2×10^9 a 6×10^9 espermatozoides por ml, valores também encontrados em nosso estudo. Todos os demais parâmetros avaliados no espermograma apresentaram-se em conformidade com as recomendações do Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA⁽⁴⁷⁾ e, por essa razão, todos os animais foram considerados aprovados no exame andrológico.

Em nosso trabalho observamos que a temperatura retal foi superior a temperatura da superfície corporal, e essa, por sua vez, foi superior a temperatura da superfície escrotal. Resultados semelhantes foram reportados anteriormente em estudos conduzidos com caprinos⁽⁴⁸⁾ e bovinos^(49,50). A explicação para a menor temperatura testicular se deve ao eficiente mecanismo de troca de calor passiva por contracorrente, onde o sangue arterial proveniente da aorta abdominal que entra nos testículos sofre o resfriamento pelo contato direto com as veias do plexo pampiniforme⁽¹¹⁾.

A temperatura testicular de bovinos deve ser mantida entre 2 e 6 graus abaixo da temperatura retal para que a espermatogênese possa ocorrer de maneira normal^(51,2,31). Em caprinos, encontramos estes valores relativos semelhantes aos reportados para bovinos⁽⁵¹⁾. Através do exame de termografia, verificamos que a temperatura da superfície escrotal foi de pelo menos de 2,5 graus abaixo da temperatura de superfície corporal e pelo menos 6 graus abaixo da temperatura retal, resultados semelhantes aos reportados por Ramires Neto et al.⁽⁴¹⁾, que estudaram a capacidade de termorregulação testicular em equinos.

Apesar de estudos anteriores indicarem uma possível relação entre a bipartição da bolsa testicular e eficiência no processo de termorregulação, foi verificado que animais do G1 não apresentaram temperatura de superfície escrotal

inferior ao grupo controle, resultados que rejeitam a hipótese inicial de que caprinos com bipartição apresentam menor temperatura de superfície escrotal. Trabalhando com avaliação de reprodutores ovinos Mikael et al.⁽⁵²⁾, também não encontraram correlação entre a bipartição testicular e maior capacidade de termorregulação. De acordo com os autores, os ovinos utilizados nesse experimento apresentavam baixo grau de bipartição da bolsa escrotal (não ultrapassando 50%), justificando os resultados encontrados. As mesmas conclusões podem ser atribuídas à nosso estudo, já que todos os animais do G1 apresentaram grau de bipartição escrotal inferior a 50%. Por sua vez, em estudos onde o grau de bipartição da bolsa escrotal foi superior a 50% foram observadas diferenças significativas na capacidade de termorregulação entre animais bipartidos e não bipartidos, sendo que os bipartidos apresentaram características que propiciam menor temperatura testicular⁽⁵³⁾. Dessa forma, provavelmente o simples fato dos testículos apresentarem menor grau de separação não garantem termorregulação mais eficiente para caprinos.

Trabalhos anteriores reportaram que as diferentes células germinativas testiculares possuem variada sensibilidade ao aumento da temperatura local⁽²⁴⁾. Elevações na temperatura podem resultar na formação de espermatozoides anormais e afetar decisivamente as etapas intermediárias da espermatogênese, que compreendem a formação de espermatócitos e espermátides^(25,26). Para o mesmo autor, os efeitos deletérios das altas temperaturas são menos evidentes nas etapas iniciais e finais da espermatogênese que compreendem, respectivamente, a formação das espermatogônias e dos espermatozóides. Já as células de Leydig e de Sertoli parecem ser mais resistentes ao aumento da temperatura escrotal em relação às células germinativas^(25,26). De acordo com Papa e Leme⁽²⁸⁾, sinais característicos de degeneração testicular incluem o aumento da proporção de células de Sertoli/células espermatogênicas, além da presença de células gigantes multinucleadas, situação que se justifica pela maior resistência das células de Sertoli ao aumento de temperatura testicular. Em nosso trabalho não foi observada diferença entre a proporção de células germinativas testiculares entre os animais do G1 e GC, rejeitando a hipótese inicial de que caprinos com bipartição da bolsa testicular são mais eficientes no processo de termorregulação e, por isso, possuem maior capacidade espermatogênica.

Trabalhando com ultrassonografia Doppler testicular para avaliação andrológica canina, Barbosa et al.⁽⁵⁴⁾ encontraram valores semelhantes de IR e IP na avaliação do plexo pampiniforme de cães férteis comparados a cães inférteis. No entanto, constataram valores superiores para VPS e VDF para cães férteis. Nesse mesmo estudo foi constatado que cães inférteis apresentaram ramos vasculares do plexo pampiniforme mais tortuosos e com menor diâmetro, o que poderia determinar menor fluxo sanguíneo testicular sem provocar alterações de IR e IP.

Trabalhando com Ihamas Kutzler et al.⁽⁴²⁾, concluíram que a ultrassonografia Doppler é um bom parâmetro para avaliação da fertilidade. Apesar de não terem encontrado valores de IR diferentes para animais férteis e inférteis, apontaram correlação positiva para VPS e VDF com o potencial de fertilidade espermática. Comparando com nosso trabalho, encontramos valores superiores de VPS para animais bipartidos em relação aos sem bipartição, porém mais estudos se fazem necessários para determinar a relação deste parâmetro com a qualidade e fertilidade do sêmen caprino.

De acordo com Setchell⁽²⁵⁾, em carneiros não ocorrem alterações hemodinâmicas quando a temperatura testicular é inferior à temperatura de superfície corporal, no entanto, quando a temperatura testicular ultrapassa a temperatura de superfície corporal ocorre o aumento do fluxo sanguíneo local. Visto que em nosso trabalho todos os caprinos apresentaram temperatura testicular abaixo temperatura da superfície corporal, provavelmente não apresentaram aumento de fluxo sanguíneo testicular, e por isso, os valores de IR e VPS encontrados podem ser normais para a espécie caprina.

Segundo Nunes⁽⁵⁵⁾, caprinos com bipartição escrotal superior a 50% do comprimento testicular apresentam maior diâmetro e comprimento do funículo espermático, além de maior extensão do segmento da artéria testicular que passa através da região do cordão espermático. Tal particularidade anatômica pode favorecer as trocas de temperatura entre o sangue arterial e venoso por proporcionar uma maior área de contato entre as áreas vasculares. No entanto, essa característica poderia também justificar o aumento da resistência mecânica à chegada do sangue até o testículo, o que explica os valores mais elevados da IR e VPS observado em nosso estudo para a avaliação Doppler conduzida nos animais

bipartidos. Novos trabalhos se fazem necessários para avaliar se os valores superiores de IR e VPS se devem exclusivamente às particularidades anatômicas do cordão espermático de animais bipartidos ou se podem ser utilizados como marcadores de fertilidade animal, a semelhança do que ocorre com lhamas⁽⁴²⁾ e cães⁽⁵⁴⁾.

5 CONCLUSÃO

Caprinos que possuem escroto com bipartição inferior a 50% não possuem maior capacidade de termorregulação testicular, maior produção de células de linhagem espermatogênica e maior qualidade de sêmen quando comparados a caprinos sem bipartição. Estudos anteriores conduzidos na espécie caprina demonstraram maior comprimento do funículo espermático e da artéria testicular de bodes bipartidos em relação a reprodutores sem bipartição, resultados que podem justificar o aumento da velocidade de pico sistólico e resistência vascular nesse grupo de animais. No entanto, como até o presente não existe uma definição clara na literatura a respeito dos valores de referência para os parâmetros hemodinâmicos testiculares obtidos através da técnica Doppler colorido, novos estudos se fazem necessários para a melhor interpretação dos achados e para a correta implementação dessa técnica na avaliação reprodutiva de caprinos.

REFERÊNCIAS

1. Medeiros LFD, Vieira DH. *Bioclimatologia Animal.1 ed.* Rio de Janeiro:UFRRJ; 1997. 116p.
2. Kastelic JO, Cook RB, Couter GH, Saacke RG. Ejaculation increases scrotal surface temperature in bulls with intact epididymes, *Theriogenology*, Oct 1. 46(5); 1996. 889-892p.
3. Setchell BP. The Parkes Lecture Heat and the testis. *J Reprod. Fert.* 2 ed. 2;1998. 179-194p.
4. Robertshaw D. Concepts in animal adaptation: thermoregulation of the goat. *International Conference on Goat Production and Disease. Dairy Goat Journal*, Seoltsdale; 83 ed; 1982. 395-397p.
5. Nunes JF, Rieira GS, Silva AEFD, Leon FAP, Lima F. Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal. *Sobral: EMBRAPA/CNPCaprinos*; 1983.11p.
6. Kastelic JP. Understandig and evaluating bovine testes. *Theriogenology*. v95(5). Jan; 2013. 18-23p.
7. Senger JS, Yildor I, McGrath JE, Pastiga RA. Isocynate epoxy reactions in bulk andsolution. *Jornal of Applied Polymer Science*. v38; 2013. 373-382p.
8. Fourie PJ, Schwalbach LM, Neser FWC, Van der Wwsthuisen C. Effect of feeding on scrotal testicular and semen characteristics of young Dorper rams. *Word Conf. Anim. Prod. Porto Alegre*; v43; 2003.26-31p.
9. Nunes AS et.al. Descrição histológica do escroto de caprinos nativos do Estado do Piauí, segundo o grau de bipartição escrotal. *Ciência Rural*. v40. Piauí; 2010. 18-23p.
10. Senger et.al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, v22(5)Sep; 1993. 303-24p.
11. Hafez ESE. *Reprodução animal*, 6. ed. São Paulo; 1995. 582p.

12. Kastelic JP, Cook RB, Couter GG, Saacke RG. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. *Theriogenology*; v45.1995. 935-941p.

13. Machado Junior AAN. Influência da morfologia escrotal sobre a termorregulação, a biometria escroto-testicular e o comportamento sexual de caprinos nos períodos seco e chuvoso do Estado do Piauí. In: Dissertação (Mestrado Em Ciência Animal). Universidade Federal Do Piauí, Teresina; 2006. 184p.

14. Silva AEFF, Nunes JF, Melo FA. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen e seus efeitos na fertilidade de caprinos. *A Hora Veterinária*, v5; 1986. 66-69p.

15. Vieira RJ, Cardoso FTS, Azevedo LV, Cunha LL, Salviano MB. Influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Estado do Piauí. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, ed. 3; 2008. 30-35p.

16. Almeida M.M et.al. Influência da grau de bipartição escrotal sobre parâmetros reprodutivos de caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* v 30. Rio de Janeiro; 2010. 64-69p.

17. Machado AANJ, Assis CAN, Souza A, Menezes DJA, Alves FR, Souza AL, Carvalho MAM. Daily sperm production and testicular morphometry in goats according to external scrotal conformation. *Animal Reproduction Science*. v 55; 2008. 77-77p.

18. Blanchard KT, Allard EK, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. I. Apoptosis in the mechanism of germ cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*; v 22;1995. 141-148p.

19. Crespilho AM, Nichi M, Guasti PN, Freitas-dell'aqua CD, Sá Filho MF, Maziero RR, Dell'aqua Jr JA, Papa FO. 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; 2014.126-133p.

20. SETCHELL B. P. The effects of heat on the testes of mammals. *AnimReprod.*;3; 2006. 81-91p.

21. Waterhouse KE, Gjeldnes A, Tverdal A, Angelis PM, Farstad W, Haard M, Kommisrud E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. *Animal Reproduction Science*, v.117; 2010. 34-42p.

22. Vandemark N.L., Free M.K. Temperature effects. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R. The testis. 1 ed. New York: Academic Press, v.3; 1970. 233-312p.
23. Setchell B.P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G.E. Marshall's physiology of reproduction. 1 ed, Londres, v.2; 1978. 1-105p.
24. Waites GMH, Setchell BP. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G. E. Marshall's physiology of reproduction. 4 ed. v2 ; 1990. 1-105p.
25. Setchell BP. The scrotum and thermoregulation. In: The mammalian testis. Ithaca: CORNELL UNIVERSITY PRESS; 1978. 90-104p.
26. Papa FO, Leme DP. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion with testicular degeneration after external genitalia trauma. Journal of Equine Veterinary Science, v.22, n.3; 2002. 121-124p.
27. Santos DO, Simplicio AA. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. Pesq. Agropec. Bras. v.35, n.9; 2000. 1835-41p.
28. Papic, Z, Katona, G, Skrabalo, Z. The cytologic identification and quantification of testicular cell subtypes. ActaCytol, v.32; 1988. 687-706p.
29. Foresta C, Varotto A, Scandellari C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject Fertil Steril. v.57; 1992. 858-65p.
30. Leme DP, Papa, FO. Cytologic identification and quantification of testicular cell types using fine needle aspiration in horses. Equine vet Journal, v.32; 2000. 444-446p.
31. Kastelic, J.P. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. Can. J. Res. Apr, 65; 2001. 111-115p.
32. Lunstra DD, Coulter GH. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural mating fertility in beef bulls. *J AnimSci.* v.77.1997. 767-774p.

33. Gabor G et.al. Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein- Friesian breeding bulls. *Anim. Reprod. Sci*; 1998 215-24p.
34. Rubens, D.J., Bhatt, S., Nedelka, S., Cullinan, J., 2006. Doppler artifacts and pitfalls. *Ultrasound Clinics* 1, Setchell, B.P., Breed, W.G; 2006. 79-109p.
35. Nyland TG, Matton JS. U Nyland T. G. Ultra-som diagnóstico em pequenos animais. *ROCA*, 2 ed. São Paulo; 2004. 463p.
36. Pozor MA, McDonnell M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, vol. 61, no. 5; 2004 799–810p.
37. Wood MM. Spectral Doppler signatures waveforms in ultrasonography. *Ultrasound Quarterly*. v.26; 2010. 283–299p.
38. Schurich M, Aigner F, Frauscher F, Pallwein L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. *Eur J Obstet Gynecol*, v.144; 2009. 192-198p.
39. Carrillo JD, Soler M, Lucas X, Agut A. Colour and pulsed Doppler ultrason Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Human Reproduction*; 1 ed.2011. 3090-3093p.
40. Gumbsch C, Gabler A, Holzmann. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs,” *Veterinary Record*, v.151; 2002. 140-144p.
41. Ramires C.N, Monteiro GA, Sancler-Silva YFR, Resende HI, Zorzetto MF,OBA E. Effect of testicular thermoregulation on the quality of Buffalo Sperm. *Buffalo Bulletin* v.32; 2013. 489-492p.
42. Kutzler M, Tyson R, Grimes M, Timm K. Determination of testicular blood flow in camelids using vascular casting and Color Pulsed-wave Doppler ultrasonography. *Veterinary Medicine International*. v.3; 2011. 7p.
43. Batissaco L, Oliveira GC, Oliveira MM. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. *Animal Science*, v 50; 2014. 384-395p.

44. Ramires Neto et. al. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. *Livestock Science*. v35; 2013. 358-363p.
45. Barth AD, Ok R J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 1st ed. Ames: Iowa State University Press; 1989. 285p.
46. Hafez e Hafez . *Reprodução Animal*. 7.ed.São Paulo: Manole; 2004.
47. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte, CBRA; 1998. 49p.
48. Lima Júnior AD, Vianni MCE. Efeito da morfologia da bolsa escrotal na termorregulação em caprinos nativos no Nordeste do Brasil. *Ciência da Vida*. v.17; 2005. 97-107p.
49. Godinho, HP, Cardoso FM, Nascimento JF. *Anatomia dos ruminantes domésticos*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (departamento de Morfologia); 1987. 415p.
50. Kastelic JP, Cook RB, Couter GH. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Animal reproduction science*; v.55; 1997. 225-261p.
51. Coulter GH, Kastelic JP. Testicular thermoregulation in bulls *Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association of Animal Breeders Columbia*; v.22; 1994. 28-34p.
52. Mikael LDD et. al. Parâmetros anátomo-estruturais de órgãos reprodutivos de ovinos sem raça definida (SRD) nativos do Estado da Paraíba, com e sem bipartição escrotal: estudo do escroto e funículo espermático. *Pesq. Vet. Bras*. 34(7); 2014. 709-715p.
53. Machado AANJ et. al. Morphometric and volumetric ration of testicular compartments in goats according to scrotl configuration. *Journal Morphology Science*. v33; 1988. 183p.
54. Barbosa MB et. al. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology*.v84; 2015. 805-810p.

55. Nunes AS. Morfologia do funículo espermático e dos escrotos em caprinos nativos do Estado do Piauí, com diferentes configurações escrotais. In: Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal Do Piauí, Teresina; 2005.157p.