VITOR HUGO GUILGER GONZAGA

**Degeneração testicular em touros: alterações espermáticas e
sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular**

São Paulo/SP

2017

VITOR HUGO GUILGER GONZAGA

**Degeneração testicular em touros: alterações espermáticas e sua
relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo: _____

Orientador

São Paulo/SP

2017

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3559
FMVZ

Gonzaga, Vitor Hugo Guilger
Degeneração testicular em touros: alterações espermáticas e sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular. / Vitor Hugo Guilger Gonzaga. -- 2017.
105 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Bovinos. 2. Temperatura média da superfície escrotal. 3. Termografia.
4. Ultrassonografia. 5. Vascularização. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto Intitulado "Degeneração testicular em touros: alterações espermáticas e sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular", protocolado sob o CEUA nº 2897220616, sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini** e equipe: Vitor Hugo Guilger Gonzaga; Laura Nataly Garcia Oliveros; Leonardo Batissaco; Vinicius José Moreira Nogueira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2016.

We certify that the proposal "Testicular degeneration in bulls: sperm abnormalities and their relationship with testicular thermodynamics and hemodynamics ", utilizing 16 Bovines (16 males), protocol number CEUA 2897220616, under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini** and team: Vitor Hugo Guilger Gonzaga; Laura Nataly Garcia Oliveros; Leonardo Batissaco; Vinicius José Moreira Nogueira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2016](#) a [07/2017](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Procedência: [Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [29 a 32 meses](#)

N: [16](#)

Linhagem: [Nelore](#)

Peso: [545 a 660 kg](#)

Resumo: O estresse térmico em touros é um fator muito importante, pois, afeta negativamente seu comportamento reprodutivo, diminui sua eficiência reprodutiva, podendo levar à infertilidade, ou mesmo a esterilidade do animal, com significativo impacto na fertilidade dos rebanhos. Uma das consequências do estresse térmico é a degeneração testicular. O presente projeto visa avaliar as alterações na termodinâmica escrotal, hemodinâmica testicular e de glândulas sexuais acessórias de touros com degeneração testicular e verificar sua relação com as alterações estruturais e funcionais espermáticas. Serão utilizados 24 touros da raça Nelore separados em dois grupos experimentais: Controle: animais sem alterações testiculares (CON, n = 12) e Degeneração: animais com degeneração testicular (DT, n = 12). A degeneração testicular será induzida por estresse térmico testicular, utilizando-se bolsas insuladoras testiculares mantidas por 72 horas. Os animais serão submetidos semanalmente a avaliações clínicas e seminais. As avaliações serão baseadas nas características clínicas gerais (frequência respiratória e temperatura corporal) e testiculares (temperatura, consistência e perímetro testicular, bem como homogeneidade e hemodinâmica do parênquima testicular); características seminais (volume, concentração, motilidade, vigor, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrosomal, função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica). Além disso, serão aferidas temperatura e umidade ambientais diariamente pelo aparelho Data Logger. Os dados obtidos serão analisados pelo programa Statistical Analysis System, com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). Os dados serão submetidos à Análise de Variância e será adicionado o fator medidas repetidas no tempo. As probabilidades de interações com o tempo serão determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisser, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado será de 5%.

Local do experimento: Centro de Biotecnologia de Reprodução Animal (CBRA-VRA) □ FMVZ/USP Campus Pirassununga

São Paulo, 04 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUILGER GONZAGA, Vitor Hugo

Título: **Degeneração testicular**: alterações espermáticas e sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Carlos Gonzaga e Maria Aparecida Guilger Gonzaga e irmãs Vanessa Cristiane e Samanta Tatiane, seres humanos exemplos de honestidade, educação e integridade, e que em todos os momentos da minha vida foram presentes e apoiadores de todos os meus sonhos mesmo quando pareciam inalcançáveis, e mesmo crescidos e distantes uns dos outros, nunca perdemos a essência de nossa família, sempre prevalecendo a união e amor ensinados pelos nossos amados pais. Dedico também ao presente que Deus nos agraciou em 2016, minha flor e sobrinha, Lis. Aos meus avôs Lázaro e Vicentina (in memorian). NEOQEAV

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Agradeço aos meus pais e irmãs pelo apoio, paciência, amor e carinho.

Agradeço a Fernanda pelo carinho e pela companhia.

Ao Departamento de Reprodução Animal desta casa, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, à Universidade de São Paulo e principalmente a professora Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini pela atenção, paciência e carinho.

Aos professores da casa, principalmente os professores Rubens, Mário, Ed, Kiky e André, que me conquistaram e muito me ensinaram. Tenho por todos um enorme carinho e com certeza os levarei em meu coração e em minhas lembranças.

Aos funcionários Clayton, Harumi, Seu João, Seu Zé Maria, Márcio, Rildo, Ricardo, Alexandra e as tias da limpeza, toda minha gratidão.

Ao campus da USP “Fernando Costa” onde pude realizar o experimento.

Aos professores da Instituição de Ensino onde conclui a graduação.

Agradeço a todos que acreditaram em minha capacidade em dar continuidade aos estudos na melhor e mais bem conceituada Universidade da América Latina.

A todos os meus colegas da pós-graduação do departamento de Reprodução Animal e dos demais departamentos e aos colegas do Laboratório de Ensino e Pesquisa da Patologia da Reprodução (LEPPaR), Bruna, Fabian, Felipe, Shirley, Vinícius, Sâmara, Flávia, Nataly, Laís, Kelcy, Isa, Débora, Marcos e Creonte e demais estagiários que me ajudaram durante os experimentos e outras atividades.

Agradeço principalmente a dois colegas mais que especiais, que estiveram sempre presente durante todo meu mestrado, e passaram a fazer parte da minha vida. São eles Maíra (Doce) uma das responsáveis pela minha decisão em fazer a pós-graduação na área, pois no final de 2014 ministrou na Instituição de Ensino onde eu estudava um apaixonante minicurso de andrologia em carneiros, curso esse que acabou com todas minhas dúvidas. No dia seguinte para surpresa dela eu já estava batendo nas portas dos professores pedindo um estágio. Meu muito obrigado, sou eternamente grato pelo carinho e palavras acolhedoras durante os dois anos de estudos, no experimento, na estatística do trabalho e até os dias de hoje, você é 10 mulher, e o Leonardo (Bati) parceiro e companheiro para todo momento, dentro e fora do departamento, sempre disposto a ajudar e oferecer um ombro amigo, desde o dia que o conheci se mostrou solícito e até os últimos dias de escrita de minha dissertação muito me auxiliou nas tabelas, gráficos, excel, inglês, até mesmo

disponibilizando um cantinho em sua casa para que eu pudesse terminar meu trabalho, uma grata surpresa, a amizade de ambos.

Agradeço a minha colega de graduação Talita Conti pelo incentivo e apresentação ao departamento e aos professores da casa e também pelo seu companheirismo na época em que éramos estagiários.

Ao CNPq, agência que me apoiou financeiramente no desenvolvimento deste projeto.

Aos animais do meu convívio e principalmente aqueles que fizeram parte do experimento a minha gratidão e carinho, que Deus os abençoe.

A todos os colegas que ganhei nestes dois anos de Pirassununga, principalmente na Piramodels e Colméia.

À cidade de Pirassununga e seus moradores pelo acolhida e carinho.

"É muito difícil você conseguir vencer numa boa. Para vencer você tem que lutar, e essa luta muitas vezes significa indispor de certa forma com algumas pessoas, para prevalecer aquilo que você acredita. Teu ponto de vista, tua cabeça, a tua personalidade acima de tudo. E se você não lutar para valer, você acaba perdendo teu próprio rumo. E se você perde o teu próprio caminho, você não é ninguém. Então, para conseguir manter essa linha de conduta, você tem que lutar muito. E muitas vezes, tem que brigar mesmo. Deus é forte, Ele é grande, e quando Ele quer, não tem quem não queira".

(Ayrton Senna)

RESUMO

GUILGER GONZAGA, V.H. **Degeneração testicular**: alterações espermáticas e sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular. [**Testicular degeneration**: sperm alterations and their relationship with testicular thermodynamics and hemodynamics]. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O estresse térmico em touros é um fator muito importante, pois afeta negativamente o comportamento reprodutivo e diminui a eficiência reprodutiva. Uma das causas deste efeito adverso é a ineficiência da termorregulação testicular, que conduz ao aumento do metabolismo celular, causando estresse oxidativo e apoptose das células germinativas, o que caracteriza a degeneração testicular, que pode levar à infertilidade, ou mesmo à esterilidade do animal. A degeneração testicular pode ser diagnosticada pela palpação do órgão, aferição do perímetro escrotal e pelo espermograma. No entanto, outras ferramentas podem ser empregadas para auxiliar no diagnóstico desta alteração, entre elas estão a termografia e a ultrassonografia. Desta forma, neste trabalho avaliou-se a eficiência do termógrafo e do ultrassom como instrumentos auxiliares para o diagnóstico da degeneração testicular em bovinos. Para o presente estudo utilizaram-se 16 touros da raça Nelore separados em dois grupos experimentais: Controle: animais sem indução à degeneração testicular (CON, n = 08); e Degeneração: animais induzidos à degeneração testicular (INS, n = 08) por meio de bolsas insuladoras mantidas por 96 horas. Os animais foram submetidos semanalmente a avaliações das características clínicas e seminais, realizando-se as análises duas semanas antes da insulação testicular (S-2 e S-1), no dia da retirada da bolsa (D0) e durante quatro semanas após a retirada da mesma (S+1 a S+4). Foram avaliadas frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR); avaliações testiculares: perímetro escrotal (PE), consistência testicular (CT), temperatura média da superfície escrotal (TMSE), ecotextura (ETT), ecogenicidade (EGT) e vascularização do parênquima testicular (EVT), vascularização (EVP) e índice de resistência vascular (RIP) do plexo pampiniforme. O sêmen dos touros foi colhido e avaliado considerando motilidade (MT), vigor (VG), morfologia (defeitos maiores, menores e totais), integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (PIAIA).

Para a análise estatística foi utilizado o *Statistical Analysis Software* (SAS 9.3). Os dados das avaliações realizadas em S-2 e S-1 foram submetidos ao procedimento MIXED considerando dois grupos (CON e INS). Os dados das avaliações realizadas após a insulação foram submetidos ao procedimento MIXED e adicionando o fator tempo por meio do comando REPEATED. O nível de significância considerado foi de $P \leq 0,05$, sendo considerada tendência quando este ficou entre 0,051 e 0,1. Foram realizadas correlações de Pearson, utilizando-se o programa StatView (SAS, 1999). Os grupos de touros foram semelhantes nas semanas pré-insulação. Nas semanas pós-insulação, notou-se interação entre tempo e tratamento para FR ($p=0,04$), CT ($p=0,0003$) e RIP ($p=0,03$) e tendência para EVT ($p=0,08$). Foram observados maiores valores para TMSE, ETT e EVT para INS do que para CON, mas menores valores de PE, CT, EVP e RIP para INS do que para CON. Além disso, encontrou-se interação entre tempo e tratamento para MT ($p=0,01$), defeitos morfológicos ($p < 0,001$) e alto potencial mitocondrial (AP, $p=0,01$) e tendência para PIAIA ($p=0,07$). O grupo INS apresentou queda na MT, PIAIA e AP, associado com aumento nos defeitos morfológicos. Foram verificadas correlações entre as características ambientais (temperatura ambiente e umidade relativa do ar) e os termogramas. Os termogramas apresentaram correlações com parâmetros vitais e achados testiculares. A hemodinâmica apresentou correlações mais fracas com outras características testiculares. Concluiu-se que o estresse térmico testicular provoca um quadro de degeneração testicular, caracterizado por redução na CT e na MT, PIAIA, PI e AP, além de aumento de defeitos morfológicos espermáticos. Este quadro é acompanhado pelo aumento da TMSE somente no dia da retirada das bolsas, provoca heterogeneidade do parênquima testicular, aumenta a vascularização testicular, reduz a vascularização do plexo pampiniforme e o RI dos vasos do plexo pampiniforme. Desta forma, a termografia e a ultrassonografia testiculares contribuem para o diagnóstico da degeneração testicular em touros.

Palavras-chave: Bovinos. Temperatura Média da Superfície Escrotal. Termografia. Ultrassonografia. Vascularização.

ABSTRACT

GUILGER GONZAGA, V.H. **Testicular degeneration**: sperm alterations and their relationship with testicular thermodynamics and hemodynamics. [**Degeneração testicular**: alterações espermáticas e sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular]. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Heat stress in bulls is a very important factor because it adversely affects the reproductive behavior and reduces the reproductive efficiency. One of the causes of this adverse effect is the inefficiency of testicular thermoregulation, which leads to increased cellular metabolism, causing oxidative stress and apoptosis of germ cells, which characterizes testicular degeneration, which can lead to infertility or even to animal sterility. Testicular degeneration can be diagnosed by palpation of the testicles, scrotal perimeter and sperm analyses. However, other tools can be used to aid in the diagnosis of this alteration, such as thermography and ultrasonography. Thus, this study evaluated the effectiveness of thermography and ultrasound as auxiliary tools in the diagnosis of testicular degeneration in cattle. For the present study, 16 Nelore bulls were divided in two experimental groups: Control: animals without induction to testicular degeneration (CON, n = 08); and Degeneration: animals induced to testicular degeneration (INS, n = 08) through insulation bags, maintained for 96 hours. Animals underwent weekly evaluations of clinical and seminal characteristics, performed assessments two weeks prior to testicular insulation (S-2 and S-1), on the day of the removal of the bag (D0) and during four week after removal of the bag (S+1 to S+4). The following were evaluated: heart rate (HR), respiratory rate (RR) and rectal temperature (RT); testicular evaluations: scrotal circumference (SC), testicular consistency (TC), mean temperature of the scrotal surface (MTSS), echotexture (ETT), echogenicity (EGT), vascularization of testicular parenchyma (VTP), vascularization of the pampiniform plexus (VPP) and resistance index (RI). The semen of the bulls was collected and evaluated considering motility (MT), vigor (VG), morphology (major, minor and total defects), plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential (PIAIA). Statistical analysis was performed using Statistical Analysis Software (SAS 9.3). Data from the S-2 and S-1 evaluations were submitted to the MIXED procedure considering two

groups (CON and INS). Data from the evaluations performed after the insulation were submitted to the MIXED procedure adding the time factor through the REPEATED command. The significance level considered was $P \leq 0,05$, being considered a trend when it was between 0,051 and 0,1. Pearson correlations were performed using the StatView program (SAS, 1999). The groups were similar in the pre-insulation period. In the post-insulation weeks, it was noted the interaction between time and treatment for RR ($p = 0.04$), TC ($p = 0.0003$) and RI ($p = 0.03$) and a tendency to VTP ($p = 0,08$). Greater values were observed for MTSS, ETT and VTP for INS than for CON, but lower values of SC, TC, VPP and RI for INS than for CON. In addition, there was interaction between time and treatment for MT ($p = 0.01$), morphological defects ($p < 0.001$) and high mitochondrial potential (HMP, $p = 0.01$) and tendency for PIAIA ($p = 0,07$). The INS group presented decrease in MT, PIAIA and HMP, associated with increase in morphological defects. Correlations were found between the environmental characteristics (temperature and relative humidity) and thermograms. The thermograms presented correlations with vital parameters and testicular findings. Hemodynamics showed weaker correlations with other testicular characteristics. In conclusion, testicular heat stress causes a testicular degeneration, characterized by reduction in TC and MT, PIAIA, PI and HMP, in addition to an increase in spermatid morphological defects. This situation, accompanied by the increase in MTSS only on the day of the removal of the bags, causes testicular parenchyma heterogeneity, increases testicular vascularization, reduces pampiniform plexus vascularization and RI of pampiniform plexus vessels. Thus, testicular thermography and ultrasonography contribute to the diagnosis of testicular degeneration in bulls.

Keywords: Bovine. Mean Scrotal Surface Temperature. Thermography. Ultrasonography. Vascularization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais utilizados no experimento realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga – 2016 45

Figura 2 - Bolsa utilizada para a insulação testicular dos touros Nelore durante o experimento 46

Figura 3 - Touros utilizados nos experimento realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga – 2016. Animal à esquerda do grupo controle e animal à direita induzido à degeneração testicular pelo uso da bolsa insuladora 46

Figura 4 - Ilustração do esquema experimental das avaliações clínicas, termográficas, ultrassonográficas e seminais, realizadas pré e pós-insulação testicular dos touros 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média $\pm$ erro padrão das características clínicas: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), perímetro escrotal (PE), consistência testicular (CT), temperatura média da superfície escrotal da manhã (TMSE M), temperatura média da superfície escrotal da tarde (TMSE T), ecotextura do parênquima testicular (ETT), ecogenicidade do parênquima testicular (EGT), escore de vascularização do parênquima testicular (EVT), escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) e índice de resistência do plexo pampiniforme (RIP) dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nas semanas S-2 e S-1..... 55

Tabela 2 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas: motilidade total (MT), vigor (VG), defeitos maiores (DMAio), defeitos menores (DMen), defeitos totais (DTot), membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), membrana plasmática íntegra (PI), membrana acrossomal íntegra (AI) e alto potencial mitocondrial (AP) dos touros dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nas semanas S-2 e S-1 56

Tabela 3 - Média $\pm$ erro das características clínicas: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), perímetro escrotal (PE), consistência testicular (CT), temperatura média da superfície escrotal da manhã (TMSE M), temperatura média da superfície escrotal da tarde (TMSE T), ecotextura testicular (ETT), ecogenicidade (EGT), escore de vascularização do parênquima testicular (EVT), escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) e índice de resistência do plexo pampiniforme (RIP) dos touros dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 57

Tabela 4 - Média $\pm$ erro padrão da frequência cardíaca (FC, bpm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4 58

Tabela 5 - Média $\pm$ erro padrão da frequência respiratória (FR, mrpm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....58

Tabela 6 - Média $\pm$ erro padrão da temperatura retal (TR, °C) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....59

Tabela 7 - Média $\pm$ erro padrão do perímetro escrotal (PE, cm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....60

Tabela 8 - Média $\pm$ erro padrão da consistência testicular (CT, 1 - 5) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+ 1 a S+4 61

Tabela 9 - Média $\pm$ erro padrão da temperatura média da superfície escrotal (TMSE M, °C) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4, no período matutino..... 61

Tabela 10 - Média $\pm$ erro padrão da temperatura média da superfície escrotal (TMSE T, °C) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4, no período vespertino..... 62

Tabela 11 - Média $\pm$ erro padrão da ecotextura do parênquima testicular (ETT, 0 – 2) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 62

Tabela 12 - Média $\pm$ erro padrão da ecogenicidade testicular (EGT, 0 – 3) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 63

Tabela 13 - Média $\pm$ erro padrão do escore da vascularização do parênquima testicular (EVT, 0 – 4) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....63

Tabela 14 - Média $\pm$ erro padrão do escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP, 1 – 5) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 64

Tabela 15 - Média $\pm$ erro padrão do índice de resistência do plexo pampiniforme (RIP, 0 - 1) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4 64

Tabela 16 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas: motilidade total (MT), vigor (VG), defeitos maiores (DMAio), defeitos menores (DMen), defeitos totais (DTot), membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), membrana plasmática íntegra (PI), membrana acrossomal íntegra (AI) e alto potencial mitocondrial (AP) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....65

Tabela 17 - Média $\pm$ erro padrão da motilidade total (MT, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....66

Tabela 18 - Média $\pm$ erro padrão do vigor (VG, %) espermático dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....66

Tabela 19 - Média $\pm$ erro padrão dos defeitos maiores (DMAio, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....67

Tabela 20 - Média $\pm$ erro padrão dos defeitos menores (DMen, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....67

Tabela 21 - Média $\pm$ erro padrão dos defeitos totais (DTot, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....68

Tabela 22 - Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana plasmática intacta, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de

membrana mitocondrial (PIAIA, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....69

Tabela 23 - Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (PI, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 69

Tabela 24 - Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (AI, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 70

Tabela 25 - Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (AP, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4..... 70

Tabela 26 - Correlações entre temperatura e umidade ambientais, temperaturas corporais, parâmetros vitais e características testiculares de touros da raça Nelore hígidos e com variados graus de degeneração testicular..... 71

Tabela 27 - Correlações entre temperaturas corporais (termogramas), parâmetros vitais e características testiculares de touros da raça Nelore hígidos e com variados graus de degeneração testicular 71

Tabela 28 - Correlações entre parâmetros vitais e características testiculares de touros da raça Nelore hígidos e com variados graus de degeneração testicular ..72

Tabela 29 - Temperaturas ambientais máxima e mínima (°C) e Umidade relativa do ar máxima e mínima (%) aferidas no curral de manejo localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA/FMVZ), Campus de Pirassununga, no período pré-insulação (S-2 e S-1), no D0 e pós-insulação (S+1 a S+4) 105

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variação das temperaturas ambientais média, máxima e mínima (°C) aferidas no curral de manejo localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA/FMVZ), Campus de Pirassununga, durante o período do experimento de 19 de setembro a 30 de outubro de 2016, Pirassununga, SP 48

Gráfico 2 - Variação das umidades relativas do ar média, máxima e mínima (%) aferidas no curral de manejo localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA/FMVZ), Campus de Pirassununga, durante o período do experimento de 19 de setembro a 30 de outubro de 2016, Pirassununga, SP 48

Gráfico 3 - Média $\pm$ erro padrão da frequência respiratória (FR, mrpm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AI	Membrana acrossomal íntegra
AP	Alto potencial mitocondrial
bpm	Batimentos por minuto
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
Cd	Cádmio
cm	Centímetro
CON	Controle
CT	Consistência testicular
DEG	Degeneração testicular
DMaio	Defeitos maiores
DMen	Defeitos menores
DTot	Defeitos totais
EDV	Velocidade máxima distólica final
EGT	Ecogenicidade
ETT	Ecotextura testicular
EVP	Escore de vascularização do plexo pampiniforme
EVT	Escore de vascularização do parênquima testicular
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INS	Insulado
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
mrpm	Movimentos respiratórios por minuto
n	Número
nm	Nanômetro
NRC	National Research Council
PE	Perímetro escrotal
PI	Membrana plasmática íntegra
PIAIA	Membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial
PIB	Produto Interno Bruto
PSV	Pico de velocidade sistólica
RIP	Índice de Resistência
S	Semana
séc	Século
TALP	Tyrode Albumina Lactato e Piruvato
TIV	Termografia infravermelha
TMSE M	Temperatura média da superfície escrotal da manhã
TMSE T	Temperatura média da superfície escrotal da tarde
TR	Temperatura retal
US	Ultrassom

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
°	grau
=	igual
≥	maior ou igual
>	maior
≤	menor ou igual
<	menor
±	mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	TERMORREGULAÇÃO	29
2.2	DEGENERAÇÃO TESTICULAR	30
2.3	INDUÇÃO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR	31
2.4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR	33
2.4.1	Ultrassonografia	34
2.4.2	Termografia	37
3	HIPÓTESES	40
4	OBJETIVOS	42
5	MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL	44
5.2	ANIMAIS	44
5.3	ESQUEMA EXPERIMENTAL	45
5.4	AVALIAÇÕES CLÍNICAS	49
5.5	COLHEITA DO SÊMEN	51
5.6	AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS	51
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	52
6	RESULTADOS	55
6.1	PERÍODO PRÉ-INSULAÇÃO	55
6.2	PERÍODO PÓS-INSULAÇÃO	57
6.2.1	Características clínicas	57
6.2.2	Características espermáticas	65
6.2.3	Correlações entre as características ambientais e clínicas	71
7	DISCUSSÃO	74
8	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	105

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Segundo levantamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2014 o agronegócio já representava aproximadamente 22% do Produto Interno Bruto (PIB) total da economia brasileira, sendo 30% produzidos somente pela pecuária (BRASIL, 2014) em um total aproximado de 212,3 milhões de animais. Um ano após, nova pesquisa já apontava aumento de quase 1,5% em relação ao período anterior, alavancando esse número para 215,2 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2015), valores relevantes, pois mesmo em meio à crise, o agronegócio deve ter crescimento de 2% em 2017 (BRASIL, 2016), e manter assim o país como um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina do mundo (ABIEC, 2017).

Sabendo da magnitude dos números e do destaque da bovinocultura na economia do país, a área da reprodução animal é indispensável para a manutenção e aumento do rebanho brasileiro. Das fêmeas em idade reprodutiva (vacas e novilhas de corte ou leiteira), 88% são servidas por monta natural (pecuária extensiva) (ASBIA, 2014; PAIVA 2015). Cada touro é responsável pela cobertura de aproximadamente 25 a 30 fêmeas por estação de monta (FRANCO; FONSECA; GASTE, 2006; FONSECA, 2009; EMBRAPA, 2011) e sua fertilidade é avaliada pela taxa de prenhez/ano (SILVA et al., 2002), o que revela o quanto é importante o potencial reprodutivo dos machos para toda essa cadeia.

O potencial reprodutivo do touro é a soma de fatores, como idade, condição física, perímetro escrotal, genética, libido e qualidade do sêmen, características que suportam o animal para o processo de fecundação do seu gameta com o da fêmea (FONSECA; CRUDELI; COSTA E SILVA, 1991), porém interferências externas, como por exemplo, o meio (estresse térmico) também pode influir na qualidade seminal e como resultado acarretar no declínio de seu potencial reprodutivo (FONSECA et al., 1992).

Existem diversos fatores que podem diminuir os índices reprodutivos de propriedade rurais, principalmente nas extensivas, e entre eles está a alteração conhecida como degeneração testicular (DEG), caracterizada por promover alterações no parênquima testicular, provocar mudanças nas células germinativas e

alterações bioquímicas locais, que resultam no aumento das anormalidades morfológicas espermáticas e na diminuição da produção e mobilidade de espermatozoides (HANSEN, 2009; GARCIA, 2017).

A DEG é causada principalmente pela perda da capacidade de termorregulação dos testículos (MOULE; WAITES, 1963) e vários são os fatores que podem desencadear este processo, como por exemplo, a dermatite escrotal, edema, hidrocele, criptorquidismo, inflamações, gordura escrotal (SETCHELL, 1988; NASCIMENTO; SANTOS, 2003), deficiências nutricionais como a carência de vitamina A (retinol) (VAN CAMP, 1997; ZERVOS et al., 2005; GOFF, 2006), traumas ou processo febril (BARTH; BOWMAN, 1994); porém, o aumento da temperatura e o estresse térmico podem ser caracterizados como as principais causas para o desenvolvimento da DEG (MOULE; WAITES, 1963; BARROS et al., 2015), sendo assim, as elevadas temperaturas registradas no Brasil podem influenciar diretamente na temperatura escrotal, e também desencadear tal alteração.

O Brasil, segundo mensurações do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (2016) apresenta temperaturas elevadas de aproximadamente 24°C. No ano de 2015 registrou-se a média de 24,74°C, com desvio de 0,96°C acima do promédio, fato este observado anteriormente em 1998, colocando-o como o ano mais quente já registrado desde 1961 (INMET, 2015). Ainda segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (2016), no ano de 2016, as temperaturas ficaram de 2 a 3°C acima da média, em uma faixa que envolveu as regiões Norte, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do país. Coincidentemente nestas três últimas regiões, encontram-se o maior contingente de rebanho de bovinos (IBGE, 2015).

As altas temperaturas e consequentemente o desconforto térmico, causam muitas vezes no animal, um desequilíbrio endócrino que acarreta estresse e diminuição no desempenho reprodutivo tanto de machos quanto de fêmeas (HANSEN, 2009). Em machos, podem contribuir para o aumento da temperatura testicular nos touros maduros, perda da termorregulação do órgão e desarranjo da espermatogênese (PALMER, 2016), e com isso estimular o início da DEG. Por este motivo, observações rotineiras dos animais selecionados para a reprodução são indispensáveis. Segundo Corrêa e colaboradores (2006) as avaliações clínica e espermática indicam a funcionalidade adequada do aparelho reprodutivo do macho, deveras, é o responsável pelas funções reprodutivas que abrangem desde a

produção espermática (espermatogênese) até sua deposição no trato reprodutivo da fêmea.

Para o estudo da degeneração testicular de forma controlada, se faz necessária a sua indução por meios já consagrados, como os agentes que induzem danos à barreira hemato-testicular (MRUK; CHENG, 2004) ou meios que induzem ao aumento da temperatura testicular, como uso de câmara climática (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953; MEYERHOEFFER et al., 1985) ou o uso de bolsas insuladoras testiculares (RAO, 1967; MUCCIOLO, BARNABE; BARNABE, 1974; GARCIA, 2004; ALVES et al., 2016). As câmaras climáticas controlam a temperatura ambiente conforme o interesse do estudo, porém, a introdução de touros neste sistema causa alterações sistêmicas e provoca assim, aumento da taxa respiratória, redução da ingestão e do processo ruminal e diminuição de sua produtividade (KADZERE et al., 2002). Por outro lado, as bolsas insuladoras, meio utilizado por diversos pesquisadores como Rao (1967), Mucciolo, Barnabe e Barnabe (1974), Garcia (2004) e Alves et al. (2016) evitam o insulto sistêmico e provocam alterações locais, pontualmente nos testículos (insulação testicular). As bolsas evitam a troca de temperatura entre o escroto e o meio ambiente, que promovem o desarranjo na espermatogênese e no epitélio seminífero do animal (VOGLER et al., 1993; SETCHEEL, 1998) e podem induzir à degeneração testicular.

O diagnóstico da degeneração testicular e seu prognóstico são eminentemente relevantes em propriedades rurais e centrais de reprodução, pois podem antever a cronicidade de tal alteração, poupar reprodutores de um descarte precoce, e se readquirirem a normalidade da fertilidade podem ser readmitidos à sua função reprodutiva, por isso é importante reavaliar os animais depois de aproximadamente sessenta dias após a retirada da causa da alteração (VAN CAMP, 1997). O acometimento ou não conformidade do aparelho reprodutor dos touros em função desta alteração deve ser avaliado por diversos métodos, como a inspeção e palpação testicular que investiga consistência, simetria, dimensão e sensibilidade (CBRA, 2013), mensuração do perímetro escrotal e análises laboratoriais do sêmen (espermograma) (VIU et al., 2006). As técnicas de análises ultrassonográficas e termográficas também podem ser utilizadas como novas ferramentas complementares para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de doenças do trato reprodutivo em diversas espécies (CBRA, 2013).

A ultrassonografia (US) é um procedimento mais rotineiro, que possibilita a visualização em tempo real de estruturas e do aparelho reprodutor dos touros (ARTEAGA; BARTH; BRITO, 2005; KASTELIC; BRITO, 2012; TOMLINSON et al., 2017). Para auxiliar no diagnóstico da degeneração testicular, o ultrassom no modo-B, analisa as imagens em escalas de cinza onde se avalia a ecotextura e ecogenicidade dos testículos. No caso de touros saudáveis não acometidos por essa alteração, suas características são bem definidas (homogêneo e moderadamente ecogênico) (PECHMAN; EILTS, 1987; RIBADU e NAKAO, 1999), e os animais acometidos pela DEG, apresentam parênquima com aspecto mais heterogêneo e dependendo do grau da alteração, pontos hiperecoicos podem ser visualizados (ARTEAGA; BARTH; BRITO, 2005; AHMADI, et al., 2012). Já a avaliação no modo Doppler permite a análise da hemodinâmica dos vasos em órgãos e tecidos (CARRILLO et al., 2012), sobrepondo à imagem em modo-B as informações coletadas em tempo real do fluxo sanguíneo, gerando assim imagens com informações anatômicas e funcionais (GINTHER; UTT, 2004). Esse método de avaliação é dividido em dois modos: primeiro, o espectral onde os ultrassons são produzidos em pulsos sonoros, possibilita um intervalo entre o pulso e o retorno do eco e resulta em uma representação gráfica da dinâmica vascular em forma de onda senoidal, no qual cada ciclo representa um ciclo cardíaco completo; segundo, o modo colorido que sobrepõe à imagem no modo B com regiões coloridas referentes às velocidades do fluxo sanguíneo. Os sinais de eco do sangue e tecidos são realizados por um sistema eletrônico. As estruturas estacionárias ou em movimento lento fornecem a base da imagem no modo cinza e os ecos das células sanguíneas são processados e informam a existência e direção do movimento, formando as imagens coloridas (TORP-PEDERSEN; TERSLEV, 2008; SILVA, 2010). Este segundo modo é muito utilizado na medicina humana, onde se avalia a vascularização, mas têm-se pouco conhecimento deste modo sobre o aparelho reprodutor de animais machos (GINTHER, 2007), porém sabe-se que alterações vasculares nos testículos podem causar danos na produção espermática e refletir na motilidade e morfologia celular (BATISSACO et al., 2013).

Já a termografia (TIV) capta diferentes ondas eletromagnéticas de frequências infravermelhas emitidas por um corpo e as representa graficamente o que permite a análise fisiológica da região (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988). Em bovinos, Purohit e colaboradores (1985) utilizaram essa ferramenta para

estabelecer o padrão de distribuição da temperatura na superfície escrotal, enquanto Kastelic, Coulter e Cook (1995) a utilizaram para determinar temperatura escrotal subcutânea, intratesticular e intra-epididimária. Por meio da termografia também foi possível realizar o monitoramento da temperatura testicular de lhamas (HEATH et al., 2002) e mais recentemente um estudo realizado com carneiros revelou que o aumento da temperatura média da superfície escrotal monitorado pelo termógrafo acarreta em um declínio na qualidade espermática desses animais (ALVES et al., 2016). A TIV é uma ferramenta amplamente utilizada na medicina humana que aos poucos vem sendo introduzida na veterinária, e suas análises minuciosas das alterações de temperaturas escrotais podem fornecer informações adicionais junto das avaliações clínicas e espermáticas (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988; CAPRARO et al., 2008; NETO; RODELLO; BICUDO, 2011).

Entretanto a ultrassonografia no modo color-Doppler e espectral, e a termografia ainda se têm pouco conhecimento de suas características em relação à DEG, necessitando de estudos mais aprofundados sobre o tema (CELEGHINI et al., 2017).

Considerando estas ferramentas e o pouco conhecimento que se tem dos padrões vistos com as mesmas diante da degeneração testicular em bovinos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a termodinâmica testicular mediante a termografia escrotal, bem como a hemodinâmica do órgão pela ultrassonografia modo-B, colorido e espectral para auxiliar no diagnóstico clínico da degeneração testicular em bovinos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão literária serão abordados temas relevantes à compreensão da degeneração testicular, incluindo mecanismos fisiológicos da termorregulação testicular, caracterização da degeneração testicular e as formas de indução. Ainda serão destacados os métodos de diagnóstico já existentes, com ênfase na ultrassonografia e na termografia como instrumentos para auxiliar o diagnóstico.

2.1 TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR

O mecanismo que permite regular a temperatura corpórea interna do organismo mantendo-o compatível com a sua funcionalidade, mesmo quando há variações de temperatura ambiental é denominado termorregulação, momento em que o animal encontra-se na zona de termoneutralidade e sua produtividade está aumentada (SILVA, 2000).

Para que haja uma termorregulação apropriada dos testículos, os mesmos devem estar posicionados na maioria dos mamíferos, inclusive em bovinos, externamente à cavidade abdominal, suspensos no escroto, pendulares, em posição vertical e paralelos um ao outro permitindo que sua temperatura fique abaixo da temperatura corpórea, para facilitar a dispersão do calor (KASTELIC, 1997; REICHENBACH; MORAES; NEVES, 2008; HANSEN, 2009). Além disso, eles encontram-se móveis no interior do escroto, que possui uma pele rica em glândulas sudoríparas adrenérgicas, as túnicas celulosa, fibrosa e vaginal, dartos e cremáster. As fibras musculares da túnica dartos e cremáster, a superfície do escroto e as glândulas sudoríparas são as grandes responsáveis pelo processo de termorregulação dos testículos, elas permitem a alteração do fluxo sanguíneo do órgão, da espessura e área do escroto, aproximando-o ou afastando-o da parede abdominal, conforme as mudanças das temperaturas ambientais (BLAZQUEZ; MALLARD; WEDD, 1988; SENGHER; 2003, REICHENBACH; MORAES; NEVES, 2008; HANSEN, 2009).

Há um emaranhado de vasos sanguíneos no funículo espermático, chamado de plexo pampiniforme, que envolve a artéria espermática interna e contribui na

dissipação do calor sanguíneo antes de entrar no parênquima testicular, ou seja, há o resfriamento do sangue arterial pelo sistema de contracorrente em contato com o sangue venoso que sai dos testículos (KASTELIC; COOK; COULTER, 1996; HAFEZ, 2004; HANSEN, 2009). Quando ocorre a redução deste fluxo sanguíneo há notória diminuição na produção espermática como observado em estudos com ratos adultos (BERGH; COLLIN; LISSBRANT, 2001).

Em casos de temperaturas climáticas elevadas, os testículos também podem estar em condições de temperaturas mais altas que as normais, verifica-se então um quadro de hipóxia celular e/ou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (SETCHELL, 1998) e consequentemente morte celular, principalmente das células haploides (espermatócitos e espermátides) que são as mais vulneráveis ao estresse térmico (YIN; HAWKINS; DEWOLF; MORGENTALER, 1997), o que caracteriza assim o quadro conhecido como degeneração testicular (DEG) (SETCHELL, 1998).

2.2 DEGENERAÇÃO TESTICULAR

A degeneração testicular é uma alteração multifatorial, que acomete tanto homens quanto animais, se caracteriza por mudanças no parênquima testicular, queda na qualidade do sêmen e consequentemente redução da fertilidade (CELEGHINI et al., 2017). Esta alteração ocorre pelo aumento do metabolismo celular nos túbulos seminíferos, que leva a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio e antioxidantes. Nesta desordem há maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e estresse oxidativo, levando a lesões de membranas, DNA, morte celular e apoptose das células da linhagem espermática (SETCHELL, 1998; PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009; CELEGHINI et al., 2017).

Qualquer alteração no órgão pode predispor a degeneração, como por exemplo, a dermatite escrotal, edema, hidrocele, criptorquidismo, inflamações, gordura escrotal (SETCHELL, 1988; NASCIMENTO; SANTOS, 2003), deficiências nutricionais como a carência de vitamina A (retinol) (VAN CAMP, 1997; ZERVOS et al., 2005; GOFF, 2006), traumas ou processo febril (BARTH; BOWMAN, 1994), mas a perda da capacidade de termorregulação dos testículos ocasionada pelo aumento da temperatura ambiental é o fator principal que pode provocar o processo de

degeneração testicular (MOULE; WAITES, 1963), porém nem sempre é possível distinguir qual a sua causa primária.

Os machos introduzidos em ambientes adversos e submetidos a condições elevadas de temperaturas podem desencadear estresse térmico, o que afeta negativamente seu comportamento e eficiência reprodutiva (GARCIA, 2004) e em casos de insulto crônico, a espermatogênese pode ser comprometida, e levar a infertilidade do touro (BICUDO; SIQUEIRA; MEIRA, 2007).

A degeneração testicular (DEG) não é uma particularidade dos bovinos, e pode acometer outras espécies. Em estudos realizados por Rao, Sastry e Kotayya (1973) com búfalos, por Thomé e colaboradores (2007) com cães e Alvarenga e Papa (2009) com garanhões, foram observados quadro desta alteração. Já em bovinos *Bos taurus* o índice da DEG no Brasil é maior, pois a tolerância ao calor é menor em relação aos *Bos indicus* (zebuínos) (BRITO et al., 2004; KOIVISTO et al., 2009), porém ambos possuem elevada taxa de prevalência.

Uma das consequências mais drásticas da degeneração testicular é afetar negativamente a qualidade do sêmen (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953; WAITES, 1970) fato observado em animais criptorquídicos, que possuem um ou ambos os testículos posicionados incorretamente no escroto, ou seja, eles se encontram em temperatura acima da apropriada (SILVA, 2000; HAFEZ, 2004), e resulta em alteração na espermatogênese, diminuição da qualidade seminal, e pode levar à subfertilidade, infertilidade ou esterilidade do touro (BICUDO; SIQUEIRA; MEIRA, 2007).

Mesmo a DEG tendo grande impacto na qualidade do sêmen, quando sanada a sua causa primária há grandes chances de regeneração e restauração da função espermatogênica, ainda que não ocorra tão rapidamente. Isto acontece em virtude da resistência das espermatogônias-tronco, das células de Sertoli e de Leydig (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; HANSEN, 2009).

2.3 INDUÇÃO DA DEGENERÇÃO TESTICULAR

Para o estudo da degeneração testicular de forma controlada, se faz necessária a sua indução por métodos já estudados. E entre as técnicas utilizadas, está a aplicação de cádmio (HEW; ERICSON; WELSH, 1993), glicerol (WIEBE et al.,

2000), busulfan (ZOHNI et al., 2012), câmara climática (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953; MEYERHOEFFER et al., 1985) e a utilização de bolsas insuladoras no escroto do animal (BARNABE; BARNABE, 1974; VOGLER et al., 1993; ALVES et al., 2016).

A administração de glicerol ou cloreto de cádmio induzem danos irreversíveis à barreira hemato-testicular (MRUK; CHENG, 2004). Observou-se em estudo de Oldereid e colaboradores (1993) taxas elevadas do elemento químico Cádmio (Cd) no epidídimo e vesículas seminais de homens que tiveram morte por motivos desconhecidos, e em um outro estudo realizado por Goyer, Liu e Waalkes (2004), em ratos, os testículos também se mostraram sensíveis à toxicidade. A exposição ao Cd resulta em degeneração completa de túbulos seminíferos com grave esgotamento de células germinativas e no cessamento da espermatogênese (KHERADMAND; ALIREZAEI; DEZFOULIAN, 2015).

Outra técnica para a depleção de células germinativas é o uso do agente quimioterápico busulfan ministrado no tratamento da leucemia mieloide crônica e distúrbios sanguíneos (KANATSU-SHINOARA et al., 2003; VON BUBNOFF; DUYSER, 2010) e que desestabiliza toda a cadeia das células-tronco espermatogoniais, responsáveis pela base do processo da espermatogênese (ZOHNI et al., 2012).

A câmara climática é uma ferramenta antiga que realiza o controle da temperatura do ambiente (principalmente as elevadas), porém é de atuação sistêmica, não local. Ela apresenta efeitos sobre a termorregulação testicular, desarranjo da espermatogênese de diversas espécies animais, diminui a concentração espermática, motilidade e vigor em sêmen de carneiros (GUNN; SANDERS; GRANGER, 1942), bodes (COELHO et al., 2006), varrões (MARTINS et al., 2011) e touros (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953; MEYERHOEFFER et al., 1985), porém nos ruminantes, causa o aumento da taxa respiratória que leva a redução da ingestão e do processo ruminal, reduzindo assim, sua produtividade (KADZERE et al., 2002).

A evaporação pela pele é o recurso mais eficiente para remover o excesso de calor corporal em ambientes com temperaturas quentes (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008), sabendo deste processo físico de troca de calor com o meio, a insulação testicular por intermédio do uso de bolsas térmicas é uma das formas utilizada para incitar o estresse térmico local e não sistêmico e assim induzir ao

quadro da DEG. É uma técnica estudada e já comprovada sua eficiência (RAO, 1967; MUCCIOLO; BARNABE; BARNABE, 1974; GARCIA, 2004; FERNANDES et al., 2008; ALVES et al., 2016), que não permite a troca de calor superfície x meio, desestabiliza o equilíbrio e acarreta um desarranjo na espermatogênese e no epitélio seminífero do animal (VOGLER et al., 1993; SETCHEEL, 1998).

Vogler et al. (1993), Garcia (2004) e Alves et al. (2016) induziram a degeneração testicular com o uso de bolsas compostas por três camadas de tecidos, uma camada externa impermeável, uma camada intermediária de material isolante, e uma interna de material antiabrasivo mantida em contato direto com o escroto. A manutenção das bolsas que envolvem os testículos evita a troca de temperatura entre o escroto e o meio ambiente e impede a correta termorregulação testicular.

2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR

O exame clínico indica a DEG, porém não é o único método de diagnóstico, outras técnicas também são aplicadas. A DEG pode ser constatada muitas vezes, pela palpação do órgão, observando-se aumento da flacidez (VAN CAMP, 1997; GARCIA, 2004; ALVES, 2014). Nota-se também aumento da temperatura média da superfície escrotal (ALVES et al., 2016), atrofia e redução do perímetro escrotal (GARCIA, 2017) que está relacionado com a produção de espermatozoides (AMANN, 1962) e que foi constatado em animais insulados em estudo de Van Camp (1997). Já em fases mais avançadas e persistentes, o órgão pode tornar-se mais rígido pela presença de pontos fibróticos (aumento do conjuntivo intersticial e calcificação testicular) (AHMAD; NOAKES, 1995; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Em exames complementares como o histológico, observa-se a degeneração de espermátides, baixa espermiogênese, presença de células gigantes multinucleadas decorrentes da agregação das espermátides, espermatogônias com citoplasma vacuolizado e com núcleo picnótico, presença de tecido conjuntivo fibroso que destrói parte dos túbulos seminíferos e calcificação dos mesmos, além da membrana basal espessa e hialinizada (AHMAD; NOAKES, 1995; NASCIMENTO; SANTOS, 2003) e em casos exacerbados há a perda total das células germinativas (CELEGHINI et al., 2017).

Microscopicamente para que o espermatozoide seja considerado de qualidade viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais (ARRUDA et al., 2011), caso contrário como observado em animais acometidos por tal afecção, o ejaculado pode conter baixa ou até ausência na concentração de espermatozoides, diminuição ou ausência da motilidade (astenozoospermia) (CASADY; MYERS; LEGATES, 1953; KUMI-DIAKA; NAGARATNAM; RWUAAN, 1981; VOGLER et al., 1993; SETCHELL, 1998) e do vigor (MEYERHOEFFER et al., 1985 GARCIA, 2004), aumento na quantidade de células morfologicamente anormais (RAO, 1967; PARKINSON, 1987; VOGLER, et al., 1993) e de células com danos na integridade de membranas (GARCIA, 2004; CELEGHINI et al., 2007; ALVES et al., 2016).

Além desses recursos, existe um método mais criterioso e não menos importante para auxiliar no diagnóstico da DEG, que consegue analisar em sêmen fresco, a funcionalidade e a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial das células, utilizando sondas fluorescentes por microscopia óptica (ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007) ou até mesmo por citometria de fluxo, que possibilita a leitura de dezenas de milhares de células em um menor tempo (ARRUDA, 2000).

Outras ferramentas estão sendo estudadas para tentar aumentar a eficácia do diagnóstico e podem ser empregadas como exames complementares da degeneração testicular, entre elas estão a ultrassonografia e a termografia (CELEGHINI et al., 2017).

2.4.1 Ultrassonografia

No ano de 1873, o italiano Spallanzani descobriu que morcegos tinham a capacidade de guiar-se em ambientes sem luz desviando-se de obstáculos através do som emitido por eles, mas somente em 1880 os irmãos Jacques e Pierre Curie conseguiram comprovar o efeito piezoelétrico e a aplicação da energia ultrassônica. Depois dessas descobertas, realizaram-se diversos estudos nos períodos entre a I e II Guerra Mundial para fins militares e industriais, e em 1950 aplicou-se a ultrassonografia na medicina humana com o primeiro registro de uma imagem seccional (CARVALHO, 2014). Passado mais de uma década, no ano de 1966,

utilizou-se a ultrassonografia pela primeira vez na medicina veterinária, para a detecção de gestação em ovinos (SEOANE, GARCIA, FROES, 2011).

A imagenologia associada à clínica pode ser uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce de inúmeras afecções, e o ultrassom (US), destaca-se, pois é uma técnica prática não invasiva que permite reconhecer enfermidades, acompanhar terapêuticas e examinar o trato reprodutivo do animal por diversas vezes, sem prejudicar seu potencial reprodutivo (RIBADU e NAKAO, 1999). O estudo com esta ferramenta contempla a assistência fetal em mulheres gestantes (BODDY; ROBINSON, 1971; HERTZ et al., 1979; VINTZILEOS; CAMPBELL; NOCHIMSON, 1986; SANTOLAYA et al., 1994; HITSCHOLD; MÜNTEFERING, 2001; SUESS et al., 2009; SNOEK et al., 2017), avaliações de animais domésticos, como éguas, pequenos e grandes ruminantes, cadelas, suínos e felinos (KÄHN et al., 1990; SILVA; BARBOSA; PEREIRA, 2011) além do diagnóstico de prenhez e de processos patológicos, e o acompanhamento fetal e do aparelho reprodutor de fêmeas de diversas espécies, como vacas (REEVES; RANTANEN; HAUSER, 1984; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; ROSILES et al., 2005), pequenos ruminantes (LINDAHL, 1969; REED; CHAFFIN; ANDERSON, 1996; ELMETWALLY; ROHN; MEINECKE-TILLMANN, 2016) e equinos (PIERSON; GINTHER, 1985; CUERVO-ARANGO, 2012; CAMPOS et al., 2017; LEMES et al., 2017).

O ultrassom é importante também para o diagnóstico de doenças do sistema urinário, órgãos genitais e aparelho reprodutor do homem (WEIDNER, 1985; BEHRE et al., 1995; GRIFFITHS et al., 2007; MARTINO et al., 2014;), além de estruturas extra testiculares como o epidídimo (MITTAL et al., 2017). Na medicina veterinária é utilizado para estudo do aparelho reprodutor em bodes e carneiros (AHMAD; NOAKES; SUBANDRIO, 1991; AHMAD; NOAKES; MIDDLETON, 1993; CARAZO et al., 2014; AILUGAMI et al., 2017), garanhões (DELVENTO, et al., 1992; VARNER et al., 2000; POZOR et al., 2017) e touros (COULTER; BAILEY, 1988; SHORE et al., 1995; EVANS et al., 1996; BRITO et al., 2003; ARTEAGA; BARTH; BRITO, 2005; BARTH et al., 2008; AHMAD et al., 2011; KASTELIC; BRITO, 2012; TOMLINSON et al., 2017) e com o seu auxílio, pode selecionar, excluir ou até mesmo tratar reprodutivamente o animal.

Para a detecção de pequenas lesões e mudanças sutis do aparelho reprodutor do macho, faz-se uso de transdutores de 7,5MHz, pois os de menores frequências podem ser insuficientes para uma adequada visualização do órgão

(MATTOON; NYLAND, 2004). A ultrassonografia pode ser utilizada no modo-B (bidimensional), onde as imagens aparecem em escalas de cinza e a intensidade do eco é caracterizada pelo seu processamento em ponto luminoso no monitor, recurso amplamente aplicado para avaliação da estrutura e atividade de órgãos e tecidos, ou pode ser utilizada em modo color-Doppler (modo-B e espectral), um método também não invasivo em que é possível avaliar a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos sanguíneos (GINTHER, 1998, 2007; SILVA; BARBOSA; PEREIRA, 2011; CARVALHO, 2014) nos tecidos e órgãos (POZOR; MCDONNELL, 2004), além de elucidar em tempo real a característica de irrigação de órgãos parenquimatosos como o tecido testicular (POZOR; MCDONNELL, 2002; CARRILLO et al., 2012).

A ecotextura e ecogenicidade dos testículos saudáveis visualizadas pela ultrassonografia no modo-B é bem definida (GINTHER, 2007), o parênquima apresenta ecotextura homogênea (BRITO, 2002; AHMAD et al., 2011) e baixa ecogenicidade (CARDILLI et al., 2012; BRITO et al., 2015).

Em casos de animais acometidos pela degeneração testicular, eles apresentarão uma imagem ultrassonográfica do parênquima com aspecto mais heterogêneo e dependendo do grau da alteração, pontos hiperecoicos podem ser visualizados (AHMAD; NOAKES, 1995; BRITO et al., 2003; ARTEAGA; BARTH; BRITO, 2005; AHMADI, et al., 2012) e como observado em carneiros por Ahmadi e colaboradores (2012) há uma queda na motilidade e na porcentagem de células normais, além do aumento de espermatozoides com defeitos de cauda.

Já a avaliação no modo color-Doppler analisa a hemodinâmica dos vasos em órgãos e tecidos, como por exemplo, o tecido testicular (POZOR; MCDONNELL, 2004; CARRILLO et al., 2012). No caso do homem, essa ferramenta é utilizada para a caracterização de inúmeras doenças dos testículos, como por exemplo, a orquite (DUDEA, et al., 2010) e utilizada em correlações com a fertilidade em camelídeos (KUTZLER et al., 2002). Já o índice de resistência (RI) está intimamente relacionado com fluxo sanguíneo local (HASSAN et al., 2017) e sua mensuração nos vasos pode ser empregada para a identificação de homens inférteis (BIAGIOTTI et al., 2002), entretanto o modo colorido da ultrassonografia ainda é pouco utilizado para casos da DEG na medicina veterinária, por isso, há a necessidade de mais estudos desta ferramenta como forma de diagnóstico da alteração (CELEGHINI et al., 2017).

2.4.2 Termografia

As primeiras experiências científicas da radiação térmica começaram no final do séc XVI, através de testes ópticos de lentes, espelhos e óculos pelo renascentista Giovanni Battista della Porta. Séculos depois Leslie e Rumford aprofundaram as pesquisas (PUTLEY, 1982a) e no século XVIII, Pictet, de Saussure e Prevost estabeleceram o novo conceito de que todos os corpos irradiam calor, e que havia uma troca entre o mais e o menos quente até que ambos atingissem a mesma temperatura (PUTLEY, 1984). Já a expressão termografia, foi introduzida em 1840, pelo Sir John Herschel, que desenvolveu uma técnica para fazer o registro permanente do espectro solar no infravermelho e logo em seguida, Tyndall em 1865, demonstrou a possibilidade de converter imagens infravermelhas em visíveis (PUTLEY, 1982b).

No entanto, no século XX, durante a Segunda Guerra Mundial, os alemães desenvolveram a primeira câmera eletrônica infravermelha, e em seguida os norte-americanos também dominaram a tecnologia principalmente para fins bélicos. Entre 1950 e 1960, alguns estudos já demonstravam que as câmeras de infravermelho visualizavam estágios iniciais do câncer de mama (RICCA, 2013)

Nos dias atuais, o termógrafo é um aparelho prático e de fácil manuseio, que pode ser útil como método auxiliar no diagnóstico de doenças, porém com alguns pontos a serem aprofundados (TARANTINO, 2013). É uma técnica relativamente nova para a identificação de distúrbios reprodutivos (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988; RUEDIGER et al., 2016), que capta diferentes ondas eletromagnéticas de frequência infravermelha emitidas pelo corpo (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988). Inúmeros estudos com essa ferramenta já vêm sendo realizados no homem (NETTO; LEMOS; BARBOSA, 1984; TRUM et al., 1996; KUKKONEN et al., 2007) e em animais (STRÖMBERG, 1975; PUROHIT et al., 1985; COULTER; COOK; KASTELIC, 1997; NIKKHAH et al., 2005; ALVES et al., 2016). As alterações no padrão de temperatura escrotal podem fornecer informações adicionais junto da avaliação clínica e antes das avaliações espermáticas, e seus resultados poderão ser complementares aos achados laboratoriais que auxiliarão para o correto diagnóstico da degeneração (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988; CAPRARO et al., 2008; NETO; RODELLO; BICUDO, 2011), pois o termógrafo tem a capacidade de detectar a temperatura superficial do escroto correlacionando-a com

a testicular, e fornecer informações sobre a capacidade de manutenção dessas temperaturas, sem causar estresse ao animal (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988).

A temperatura média da superfície escrotal (TMSE) mensurada pelo termógrafo é interessante, pois quando as mesmas estão entre 2 a 6° C abaixo da temperatura corpórea comprova que o processo de espermatogênese está ocorrendo naturalmente em função da temperatura (WAITES, 1970; KASTELIC; COOK; COULTER, 1996).

Já os animais que sofrem estresse térmico induzido pela utilização de bolsas insuladoras testiculares, apresentam temperatura média da superfície escrotal acima dos valores normais, como apresentado em trabalho de Alves e colaboradores (2016), onde os carneiros do grupo insulado apresentavam TMSE maiores que os animais do grupo controle no dia da retirada das bolsas, entretanto nos demais dias não houve diferenças significativas entre os grupos.

ΗΠΟΤΕΣΕΣ

3 HIPÓTESES

A indução do estresse térmico pelo uso de bolsas insuladoras testiculares em touros provoca um quadro de degeneração testicular, que se caracteriza por redução na consistência testicular, tamanho testicular levemente reduzido e alteração nas características espermáticas, como redução da motilidade, vigor, concentração, integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e do potencial de membrana mitocondrial, além do aumento de espermatozoides com defeitos morfológicos.

Este quadro é acompanhado pelo aumento da temperatura média da superfície escrotal no dia da retirada das bolsas, da heterogeneidade do parênquima testicular e do escore de vascularização testicular, associada à redução no índice de resistência dos vasos do plexo pampiniforme.

OBJECTIVES

4 OBJETIVOS

- O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência da termografia e da ultrassonografia no diagnóstico da degeneração testicular em bovinos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a termodinâmica testicular levando em consideração a temperatura da superfície escrotal; bem como a temperatura da área de olho e temperatura retal de bovinos com degeneração testicular.
- Avaliar a hemodinâmica testicular considerando a vascularização do parênquima testicular e do plexo pampiniforme, além do índice de resistência dos vasos do plexo pampiniforme em touros com degeneração testicular.
- Avaliar a relação entre as características testiculares (perímetro escrotal, consistência testicular, ecotextura e ecogenicidade do parênquima testicular) e os achados da termodinâmica e hemodinâmica testiculares em touros com degeneração testicular.
- Avaliar a relação das características ambientais (temperatura e umidade) com os parâmetros vitais, termodinâmica, hemodinâmica testicular e espermograma em touros com degeneração testicular.
- Avaliar a relação das características espermáticas de bovinos com degeneração testicular com os achados da termodinâmica e ultrassonografia testicular.

ΜΑΤΕΡΙΑΙΣ Ε ΜΕΘΟΔΟΣ

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

Este experimento foi realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR) e Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA), ambos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no Campus “Fernando Costa”, situado na cidade de Pirassununga/SP (latitude 21°59'46" Sul, longitude 47°25'33" Oeste, altitude de 627 metros), durante a primavera do ano de 2016, no período de 19 de setembro a 30 de outubro.

5.2 ANIMAIS

Para o estudo utilizou-se 16 touros da raça Nelore com idade média de $31,31 \pm 6,06$ meses e peso médio de $598 \pm 95,09$ kg (Figura 1), alocados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (VRA - FMVZ - USP).

Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, em pastagem de capim braquiária, com água e sal mineral *ad libitum* e suplementação diária de concentrado, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (2016), além de serem submetidos a controles de endo e ectoparasitas regularmente. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (nº do protocolo 2897220616 - FMVZ/USP).

Figura 1 – Animais utilizados no experimento realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga – 2016

Fonte: (GUILGER GONZAGA, V. H., 2016)

5.3 ESQUEMA EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do experimento, os touros foram distribuídos em dois grupos experimentais: 1) Grupo controle: touros não induzidos à degeneração testicular (CON, $n = 8$); e 2) Grupo insulado: touros induzidos à degeneração testicular (INS, $n = 8$). A degeneração testicular foi estimulada colocando-se bolsas insuladoras escrotais (Figuras 2 e 3), confeccionadas, conforme descrito por Garcia (2004). As bolsas eram constituídas por três camadas de tecidos sendo uma camada externa impermeável, outra camada intermediária de material isolante e por último uma camada interna de material antiabrasivo que ficou em contato direto com o escroto. Os mesmos foram envolvidos pela bolsa durante 96 horas, de modo a evitar a troca de temperatura entre o escroto e o meio ambiente.

Figura 2 – Bolsa utilizada para a insulação testicular dos touros Nelore durante o experimento

Fonte: (GUILGER GONZAGA, V. H., 2016)

Figura 3 – Touros utilizados no experimento realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga – 2016. Animal à esquerda do grupo controle e animal à direita induzido à degeneração testicular pelo uso da bolsa insuladora

Fonte: (GUILGER GONZAGA, V. H., 2016)

Os animais de ambos os grupos foram submetidos semanalmente a avaliações clínicas e colheitas do sêmen para espermograma. Realizaram-se as análises duas semanas (14 dias) e uma semana (7 dias) antes da colocação das bolsas (período pré-insulação: semanas S-2 e S-1); no dia da retirada da bolsa (D0); e durante quatro semanas após a retirada das bolsas (período pós-insulação: semanas S+1 a S+4), como representado na Figura 4. Realizou-se avaliações da frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, características testiculares (perímetro escrotal, consistência testicular, temperatura média da superfície escrotal, ecotextura e ecogenicidade testicular, hemodinâmica do parênquima e do plexo pampiniforme e o índice de resistência); e colheitas de sêmen dos touros para as avaliações espermáticas (motilidade, vigor, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial) semanalmente.

Figura 4 – Ilustração do esquema experimental das avaliações clínicas, termográficas, ultrassonográficas e seminais, realizadas pré e pós-insulação testicular dos touros

Fonte: (GUILGER GONZAGA, V. H., 2016)

Aferiram-se juntamente com as demais análises a temperatura e umidade ambiente do local pelo aparelho Data Logger Lufft (modelo OPUS 20THI) e os dados estão apresentados como média dos dias nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Variação das temperaturas ambientais média, máxima e mínima (°C) aferidas no curral de manejo localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA/FMVZ), Campus de Pirassununga, durante o período do experimento de 19 de setembro a 30 de outubro de 2016, Pirassununga, SP

Fonte: (GUILGER GONZAGA, V. H., 2016)

Gráfico 2 – Variação das umidades relativas do ar média, máxima e mínima (%) aferidas no curral de manejo localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA/FMVZ), Campus de Pirassununga, durante o período do experimento de 19 de setembro a 30 de outubro de 2016, Pirassununga, SP

Fonte: (GUILGER GONZAGA, V. H., 2016)

5.4 AVALIAÇÕES CLÍNICAS

Realizaram-se as seguintes avaliações clínicas: frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e características testiculares.

Verificaram-se as frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) por auscultação utilizando-se estetoscópio clínico (Littmann, 3M, EUA) durante um minuto. Realizou-se a aferição da temperatura retal (TR) com auxílio de termômetro digital.

Consideraram-se nas avaliações testiculares: perímetro escrotal (PE), consistência testicular (CT), temperatura média da superfície escrotal (TMSE), ecotextura (ETT) e ecogenicidade (EGT) do parênquima e hemodinâmica do parênquima (EVT) e plexo pampiniforme (EVP) e índice de resistência (RIP).

Mediu-se o perímetro escrotal com fita métrica graduada (cm), avaliou-se a consistência testicular por palpação e classificou-se em escore de 1 a 5, sendo 1 o testículo mais flácido e 5 o testículo mais firme.

Mediu-se a TMSE durante todo o experimento com o aparelho de termografia T640 (FLIR Systems, EUA) no período matutino e vespertino, com exceção do tempo D0 onde a temperatura foi medida somente no momento da retirada da bolsa insuladora, coincidentemente no período da manhã. Analisou-se as imagens pelo programa FLIR Quick Report® (FLIR Systems, EUA) conforme Alves e colaboradores (2016). Para tal aferição, os animais mantiveram-se na sombra do curral e o termógrafo posicionado a uma distância de 0,9 m da superfície analisada, com ajuste da emissividade para 0,98; além disso, os testículos não foram manipulados por no mínimo 30 minutos antes da aferição. Realizaram-se duas avaliações diárias da TMSE, uma no período da manhã (TMSE M) e outra na tarde (TMSE T).

Realizaram-se os exames ultrassonográficos dos testículos nos modos B, color-Doppler e espectral do Ultrassom Doppler modelo M5Vet® (Mindray, China). Em todas as análises manteve-se a frequência a 5 MHz durante a visualização no modo-B, e 7,5 MHz para melhor visualização do modo color. Obteve-se as imagens com o uso de probe linear e padronizadas, para que em todas as análises a mesma incidisse longitudinalmente no terço médio do plexo e no terço médio do parênquima testicular, com movimentos de angulação de 45° para melhor avaliação da vascularização, sempre começando as investigações pelo testículo direito e em

seguida o esquerdo. Para todas as características avaliadas por escores, a nota foi dada por dois técnicos.

No modo B consideraram-se as características ecotextura e ecogenicidade do parênquima testicular. Classificou-se a ecotextura subjetivamente por dois avaliadores de acordo com a homogeneidade do parênquima em escores de 0 a 2, sendo 0 para parênquima homogêneo (sem presença de pontos anecóicos), 1 para pouco heterogêneo (com presença de poucos pontos anecóicos) e 2 para heterogêneo (presença de muitos pontos anecóicos). Avaliou-se a ecogenicidade do parênquima considerando a presença de pontos hiperecóticos, classificada de forma subjetiva em escores de 0 a 3, sendo 0 referente à ausência de pontos hiperecóticos no parênquima; 1 quando encontrados até cinco pontos hiperecóticos no parênquima; 2 quando houvesse mais de cinco pontos próximos ao mediastino mas distanciados entre si e 3 na presença de mais de cinco pontos hiperecóticos difusos no parênquima testicular conforme descrito por Alves (2014).

No modo color analisou-se a vascularização do parênquima testicular e do plexo pampiniforme. Classificou-se a vascularização do parênquima em escores de 0 a 4, sendo 0: ausência de vascularização; 1: presença de um a dois pontos de vascularização de pequeno calibre; 2: presença de dois a quatro pontos de vascularização de pequeno calibre; 3: mais de dois pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 1/3 da imagem; 4: mais de dois pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 2/3 da imagem. Classificou-se o plexo pampiniforme em escores de 1 a 5, sendo 1: 0 a 20% do plexo preenchido por vascularização; 2: 21 a 40% do plexo preenchido por vascularização; 3: 41 a 60% do plexo preenchido por vascularização; 4: 61 a 80% do plexo preenchido por vascularização; 5: 81 a 100% do plexo preenchido por vascularização, como descrito por Batissaco et al. (2013). Todas as imagens foram analisadas por dois observadores em um modelo duplo cego.

Avaliou-se no modo espectral o índice de resistência dos vasos sanguíneos do plexo pampiniforme (RIP). Calculou-se o RIP ($0 - 1$) como a proporção da diferença entre o pico de velocidade sistólica (PSV) e a velocidade máxima diastólica final (EDV), dividido pelo pico de velocidade sistólica. Obtiveram-se três valores, e destes, feito a média.

5.5 COLHEITA DO SÊMEN

Após o término do exame clínico, procederam-se as colheitas de sêmen conforme as indicações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), realizadas pelo método de eletroejaculação (Autojac V2, Neovet) com os animais adequadamente contidos no tronco. Antes de cada colheita realizou-se com tesoura a tricotomia do excesso de pelos da região do prepúcio e higienizou-se a parte interna do mesmo com solução fisiológica. Em seguida, removeram-se as fezes do reto e introduziu-se a probe previamente lubrificada com gel, com os eletrodos na posição ventral. Fixando-se o cabo, administraram-se estímulos elétricos de maneira progressiva, lenta e pulsátil, respeitando a resposta do animal, causando assim, o mínimo de estresse. O ejaculado foi obtido no momento em que o animal expôs o pênis. Desprezaram-se os primeiros gotejamentos e o restante colheu-se quando o mesmo começou a se tornar mais opaco e turvo. Realizou-se a colheita em tubos para centrifugação de 15 mL previamente aquecidos em banho-maria à 37°C e mantidos em isopor térmico durante a atividade, garantindo que não ocorresse a queda brusca da temperatura e consequentemente o choque térmico da amostra. Colheu-se quantidade suficiente para realizar todas as análises laboratoriais.

5.6 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

Encaminharam-se os ejaculados imediatamente ao Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) para análises laboratoriais. Em seguida colocaram-se em banho-maria a 37°C e durante todo o preparo utilizou-se mesa e platina aquecedoras para manipulação da amostra, mantendo assim a temperatura em torno de 37°C. Avaliou-se volume, motilidade, vigor, concentração espermática, morfologia espermática, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial.

Analísaram-se motilidade e o vigor entre lâmina e lamínula, sob microscopia de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon) em aumento de 100x de forma subjetiva, a motilidade espermática foi estimada em porcentagem (%) e o vigor foi classificado em escores de 1 a 5, sendo 1 a imagem de células com movimentos exclusivamente oscilatório e 5 caracterizado pela imagem de células com movimentos progressivos

retilíneos e muito rápidos. Para determinação da concentração espermática, procedeu-se a diluição do sêmen (1:100) em solução tamponada de formol salino e realizou-se a contagem em câmara de Neubauer com amostras diluídas.

Realizou-se a análise da morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, Eclipse 80i, Nikon), pela técnica da câmara úmida, contando-se 200 células, em aumento de 1.000x e classificando-as em porcentagem de defeitos em maiores (DMAio), menores (DMen) e totais (DTot) (BARTH; OKO, 1989).

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, uma amostra de 150 µL de sêmen foi diluída em TALP (Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate) a 25×10^6 espermatozoides/mL e adicionada sondas fluorescentes: 2 µL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular probes), 3 µL de iodeto de propídio (0,5mg/mL, Sigma-Andrich), 50 µL de lectina obtida de *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µL, Sigma-Andrich) e 2 µL de iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 µM, Sigma-Andrich). Após a adição das sondas fluorescentes, incubou-se a amostra por 8 minutos a 37°C e a leitura se fez pela contagem de 200 células por microscopia de epifluorescência em aumento de 1000x, utilizando-se filtro (D/F/R, C58420), apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm) conforme descrito por Celeghini et al. (2007). Classificaram-se os espermatozoides em porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (células PIAIA), células com membrana plasmática íntegra (PI), células com membrana acrossomal íntegra (AI) e células com alto potencial de membrana mitocondrial (AP).

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Primeiramente, realizou-se a análise estatística do período pré-insulação para a caracterização dos grupos experimentais. Submeteram-se os dados das avaliações realizadas em S-2 e S-1 à avaliação estatística pelo programa *Statistical Analysis Software* (SAS 9.3) considerando dois grupos (CON e INS). Previamente

submeteram os dados ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os que não atenderam à normalidade foram transformados, ou submetidos à análise de *outliers* e, em último caso, submetidos a testes estatísticos não paramétricos. Em seguida, os que atenderam à normalidade foram submetidos ao procedimento MIXED, sendo considerado como nível de significância $P \leq 0,05$.

Após a avaliação inicial dos grupos, consideraram-se os dados obtidos no período pós-insulação, utilizando o programa *Statistical Analysis Software* (SAS 9.3). Submeteram-se os dados previamente à avaliação das premissas verificando-se a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que não atenderam às premissas foram submetidas à retirada de *outliers*, transformação (logarítmica, quadrática ou inversa) ou ainda a testes não paramétricos. Quando necessário, o teste não paramétrico utilizado foi o de *Kruskal Wallis* (*). As variáveis que atenderam à normalidade foram submetidas ao procedimento MIXED sendo testada a melhor matriz, considerando-se o menor valor de AICC, para cada variável e adicionando-se o fator tempo por meio do comando REPEATED. Para as análises estatísticas considerou-se cinco tempos (D0, S+1, S+2, S+3 e S+4) e dois grupos (controle e insulado). O nível de significância considerado foi de $P \leq 0,05$, sendo considerada tendência quando este ficou entre 0,051 e 0,1. Os efeitos isolados de tratamento e tempo só foram considerados quando não houve interação tempo * tratamento.

Realizaram-se correlações de Pearson, utilizando-se o programa estatístico StatView (SAS, 1999), entre as características ambientais (temperatura ambiente e umidade relativa do ar) e as características clínicas dos touros (temperatura retal, temperatura ocular, temperatura média da superfície escrotal, frequência respiratória, frequência cardíaca e perímetro escrotal), ainda entre as características clínicas e os achados de ultrassonografia (ecotextura e ecogenicidade do parênquima, escore de vascularização do parênquima, escore de vascularização do plexo pampiniforme e índice de resistência) ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 PERÍODO PRÉ-INSULAÇÃO

Em relação aos resultados de caracterização (ou nivelamento biológico) dos touros no período pré-insulação (S-1 e S-2), verificou-se que os grupos CON e INS eram semelhantes quanto às características clínicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão das características clínicas: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), perímetro escrotal (PE), consistência testicular (CT), temperatura média da superfície escrotal da manhã (TMSE M), temperatura média da superfície escrotal da tarde (TMSE T), ecotextura do parênquima testicular (ETT), ecogenicidade do parênquima (EGT), escore de vascularização do parênquima testicular (EVT), escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) e índice de resistência do plexo pampiniforme (RIP) dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nas semanas S-2 e S-1

Características clínicas	CON (n=8)	INS (n=8)	GERAL	Valor de p
FC (bpm)	59,86 $\pm$ 1,60	61,26 $\pm$ 1,67	60,56 $\pm$ 1,14	0,55
FR (mrpm)	24,85 $\pm$ 0,95	25,57 $\pm$ 1,03	25,20 $\pm$ 0,69	0,61
TR (°C)	38,28 $\pm$ 0,12	38,21 $\pm$ 0,11	38,25 $\pm$ 0,08	0,67
PE (cm)	36,08 $\pm$ 0,71	34,75 $\pm$ 0,51	35,43 $\pm$ 0,45	0,14
CT (1-5)*	3,05 $\pm$ 0,09	3,21 $\pm$ 0,06	3,13 $\pm$ 0,05	0,24
TMSE M (°C)	30,04 $\pm$ 0,31	30,24 $\pm$ 0,31	30,14 $\pm$ 0,21	0,65
TMSE T (°C)	33,00 $\pm$ 0,19	33,30 $\pm$ 0,15	33,15 $\pm$ 0,12	0,23
ETT (0-2)*	0,17 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,06	0,88
EGT (0-3)*	0,14 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,12	0,18 $\pm$ 0,07	0,83
EVT (0-4)*	2,64 $\pm$ 0,20	3,09 $\pm$ 0,20	2,86 $\pm$ 0,14	0,12
EVP (1-5)*	3,64 $\pm$ 0,14	3,93 $\pm$ 0,17	3,78 $\pm$ 0,11	0,20
RIP (0-1)	0,61 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,01	0,07

Ao se considerar as características espermáticas do período pré-insulação, notou-se que os grupos CON e INS foram similares em todas as variáveis analisadas, com exceção do vigor (VG) ($p=0,01$) que foi maior no grupo INS do que no CON (Tabela 2), mas dentro das características mínimas aceitáveis para seleção de touros.

Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas: motilidade total (MT), vigor (VG), defeitos maiores (DMAio), defeitos menores (DMen), defeitos totais (DTot), membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), membrana plasmática íntegra (PI), membrana acrossomal íntegra (AI) e alto potencial mitocondrial (AP) dos touros dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nas semanas S-2 e S-1

Características espermáticas	CON (n=8)	INS (n=8)	GERAL	Valor de p
MT (%)	68,23 $\pm$ 2,05	70,31 $\pm$ 2,11	69,24 $\pm$ 1,46	0,35
VG (1-5)*	3,02 $\pm$ 0,10 ^b	3,40 $\pm$ 0,11 ^a	3,21 $\pm$ 0,08	0,01
DMAio (%)	11,62 $\pm$ 5,28	3,96 $\pm$ 0,91	8,05 $\pm$ 2,89	0,41
DMen (%)*	1,75 $\pm$ 0,42	0,92 $\pm$ 0,33	1,36 $\pm$ 0,28	0,09
DTot (%)	13,37 $\pm$ 5,64	4,88 $\pm$ 1,01	9,41 $\pm$ 3,10	0,29
PIAIA (%)	72,84 $\pm$ 3,67	79,21 $\pm$ 2,52	75,81 $\pm$ 2,32	0,17
PI (%)	79,00 $\pm$ 3,89	78,05 $\pm$ 4,39	78,54 $\pm$ 2,88	0,28
AI (%)	90,12 $\pm$ 1,88	88,86 $\pm$ 2,72	89,51 $\pm$ 1,61	0,77
AP (%)	79,00 $\pm$ 3,18	82,36 $\pm$ 5,03	80,62 $\pm$ 2,90	0,20

^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

6.2 PERÍODO PÓS-INSULAÇÃO

6.2.1 Características clínicas

Na Tabela 3 nota-se que houve efeito de interação entre tempo e tratamento para as características clínicas de FR ($p=0,04$), CT ($p=0,0003$) e RIP ($p=0,03$) e tendência para EVT ($p=0,08$).

Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão das características clínicas: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), perímetro escrotal (PE), consistência testicular (CT), temperatura média da superfície escrotal da manhã (TMSE M), temperatura média da superfície escrotal da tarde (TMSE T), ecotextura testicular (ETT), ecogenicidade (EGT), escore de vascularização do parênquima testicular (EVT), escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) e índice de resistência do plexo pampiniforme (RIP) dos touros dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Variáveis	CON (n=8)	INS (n=8)	Geral	Efeito de Trat.	Efeito de Tempo	Interação Trat. X Tempo
FC (bpm)	58,40 $\pm$ 1,36	58,50 $\pm$ 1,11	58,45 $\pm$ 0,87	0,96	0,84	0,85
FR (mrpm)	31,42 $\pm$ 1,12	30,00 $\pm$ 1,24	30,71 $\pm$ 0,83	0,26	$\leq 0,0001$	0,04
TR (°C)	38,19 $\pm$ 0,05	38,10 $\pm$ 0,07	38,15 $\pm$ 0,04	0,54	$<0,0001$	0,73
PE (cm)	36,26 $\pm$ 0,47 ^a	34,43 $\pm$ 0,35 ^b	35,34 $\pm$ 0,31	0,004	0,83	0,96
CT (1-5)	3,11 $\pm$ 0,06	2,51 $\pm$ 0,09	2,81 $\pm$ 0,06	$<0,0001$	0,09	0,0003
TMSE M (°C)	31,50 $\pm$ 0,18 ^b	32,11 $\pm$ 0,24 ^a	31,81 $\pm$ 0,15	0,01	$<0,0001$	0,66
TMSE T (°C)	33,68 $\pm$ 0,19	33,99 $\pm$ 0,13	33,84 $\pm$ 0,11	0,15	0,0007	0,75
ETT (0-2)*	0,27 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,05	0,83	0,05	0,30
EGT (0-3)*	0,27 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,05	0,85	0,52	0,89
EVT (0-4)*	2,65 $\pm$ 0,10 ^b	3,25 $\pm$ 0,11 ^a	2,95 $\pm$ 0,08	0,0005	0,51	0,08
EVP (1-5)*	4,00 $\pm$ 0,09 ^a	3,71 $\pm$ 0,11 ^b	3,85 $\pm$ 0,07	0,05	0,91	0,81
RIP (0-1)	0,59 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	0,48	0,02	0,03

A frequência cardíaca (Tabela 4) não apresentou efeitos de tratamento ($p=0,96$), nem de tempo ($p=0,84$). Os animais dos grupos controle e insulados mantiveram a frequência cardíaca constante durante todos os períodos avaliados.

Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão da frequência cardíaca (FC, bpm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	55,25 $\pm$ 2,56	57,75 $\pm$ 2,37	56,50 $\pm$ 1,71
S+1	58,00 $\pm$ 3,04	57,50 $\pm$ 2,09	57,75 $\pm$ 1,78
S+2	59,75 $\pm$ 1,94	58,00 $\pm$ 2,00	58,87 $\pm$ 1,36
S+3	59,00 $\pm$ 2,47	61,00 $\pm$ 3,18	60,00 $\pm$ 1,96
S+4	60,00 $\pm$ 4,89	58,25 $\pm$ 3,01	59,12 $\pm$ 2,78
MÉDIA	58,40 $\pm$ 1,36	58,50 $\pm$ 1,11	58,45 $\pm$ 0,87

A frequência respiratória (Tabela 5 e Gráfico 3) do grupo insulado foi maior do que do grupo controle somente no tempo S+2. As avaliações dos tempos em cada tratamento também mostraram diferenças. Assim, os animais controle apresentaram aumento da FR nas semanas S+3 e S+4 quando comparada à semana S+1, não diferindo entre os demais períodos. Nos animais insulados, a FR aumentou nas semanas S+2, S+3 e S+4 quando comparada ao D0.

Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão da frequência respiratória (FR, mrpm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	28,37 $\pm$ 2,92 ^{AB}	21,75 $\pm$ 1,57 ^B	25,06 $\pm$ 1,81
S+1	25,25 $\pm$ 1,30 ^B	25,00 $\pm$ 1,19 ^{AB}	25,12 $\pm$ 0,85
S+2	30,50 $\pm$ 1,50 ^{ABb}	37,00 $\pm$ 2,23 ^{Aa}	33,75 $\pm$ 1,54
S+3	35,00 $\pm$ 2,23 ^A	33,00 $\pm$ 1,46 ^A	34,00 $\pm$ 1,31
S+4	38,00 $\pm$ 1,69 ^A	33,25 $\pm$ 2,95 ^A	35,62 $\pm$ 1,75
MÉDIA	31,42 $\pm$ 1,12	30,00 $\pm$ 1,24	30,71 $\pm$ 0,83

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Gráfico 3 – Média $\pm$ erro padrão da frequência respiratória (FR, mrpm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

^{A,B} Pontos com letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) no tempo dentro do mesmo grupo.

^{a,b} Pontos com letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) dentro do tratamento em cada período.

A temperatura retal não apresentou efeito de tratamento ($p=0,54$), porém notou-se efeito de tempo ($p<0,0001$). Assim, a média geral da temperatura retal no dia da retirada da bolsa insuladora (D0) foi menor quando comparada com as demais semanas (Tabela 6).

Tabela 6 – Média $\pm$ erro padrão da temperatura retal (TR, °C) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	37,81 $\pm$ 0,12	37,58 $\pm$ 0,16	37,69 $\pm$ 0,10 ^B
S+1	38,23 $\pm$ 0,13	38,32 $\pm$ 0,10	38,28 $\pm$ 0,08 ^A
S+2	38,21 $\pm$ 0,11	38,06 $\pm$ 0,14	38,13 $\pm$ 0,09 ^A
S+3	38,31 $\pm$ 0,06	38,31 $\pm$ 0,17	38,31 $\pm$ 0,08 ^A
S+4	38,37 $\pm$ 0,13	38,28 $\pm$ 0,09	38,32 $\pm$ 0,08 ^A
MÉDIA	38,19 $\pm$ 0,05	38,10 $\pm$ 0,07	38,15 $\pm$ 0,04

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Para o perímetro escrotal (Tabela 7) observou-se efeito de tratamento ($p=0,004$), mas não houve efeito de tempo ($p=0,83$). O grupo insulado apresentou menor perímetro escrotal comparado com o grupo controle, efeito que é mais evidenciado a partir da S+1.

Tabela 7 – Média $\pm$ erro padrão do perímetro escrotal (PE, cm) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	36,56 $\pm$ 0,89	35,43 $\pm$ 0,87	36,00 $\pm$ 0,62
S+1	36,00 $\pm$ 1,16	33,93 $\pm$ 0,69	34,96 $\pm$ 0,70
S+2	36,18 $\pm$ 1,10	33,88 $\pm$ 0,97	35,03 $\pm$ 0,77
S+3	36,20 $\pm$ 1,26	34,76 $\pm$ 0,81	35,48 $\pm$ 0,74
S+4	36,37 $\pm$ 1,16	34,12 $\pm$ 0,67	35,25 $\pm$ 0,71
MÉDIA	36,26 $\pm$ 1,16 ^a	34,43 $\pm$ 0,35 ^b	35,34 $\pm$ 0,31

^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A consistência testicular apesar de mostrar somente uma tendência ao efeito de tempo ($p=0,09$) apresentou efeito de tratamento ($p<0,0001$). Os animais do grupo insulados apresentaram testículos mais flácidos que os do grupo controle em todas as semanas do estudo, apontando uma aparente melhora a partir da S+4. Além disso, no dia da retirada das bolsas insuladoras (DO) do grupo INS, notou-se testículos mais flácidos em relação às demais semanas (S+1, S+2, S+3 e S+4), evidenciando-se efeito de tempo dentro do grupo insulado (Tabela 8).

Tabela 8 – Média $\pm$ erro padrão da consistência testicular (CT, 1 - 5) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	3,00 $\pm$ 0,16 ^a	1,93 $\pm$ 0,22 ^{Bb}	2,46 $\pm$ 0,19
S+1	3,00 $\pm$ 0,09 ^a	2,56 $\pm$ 0,17 ^{Ab}	2,78 $\pm$ 0,11
S+2	3,06 $\pm$ 0,19 ^a	2,50 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	2,78 $\pm$ 0,12
S+3	3,25 $\pm$ 0,09 ^a	2,68 $\pm$ 0,20 ^{Ab}	2,98 $\pm$ 0,13
S+4	3,25 $\pm$ 0,13	2,87 $\pm$ 0,22 ^A	3,06 $\pm$ 0,13
MÉDIA	3,11 $\pm$ 0,06	2,51 $\pm$ 0,09	2,81 $\pm$ 0,06

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A temperatura média da superfície escrotal no período da manhã (Tabela 9) teve efeito de tratamento ($p=0,01$) e tempo ($p<0,0001$). O D0 foi o momento que apresentou maior diferença de TMSE entre os dois grupos, sendo maior no grupo INS.

Tabela 9 – Média $\pm$ erro padrão da temperatura média da superfície escrotal (TMSE M, °C) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4, no período matutino

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	32,36 $\pm$ 0,29	33,52 $\pm$ 0,42	32,94 $\pm$ 0,28 ^A
S+1	30,96 $\pm$ 0,42	31,31 $\pm$ 0,49	31,13 $\pm$ 0,31 ^{BC}
S+2	31,93 $\pm$ 0,20	32,68 $\pm$ 0,17	32,31 $\pm$ 0,16 ^A
S+3	31,62 $\pm$ 0,41	32,43 $\pm$ 0,37	32,03 $\pm$ 0,28 ^{AB}
S+4	30,61 $\pm$ 0,47	30,64 $\pm$ 0,54	30,63 $\pm$ 0,34 ^C
MÉDIA	31,50 $\pm$ 0,18 ^b	32,11 $\pm$ 0,24 ^a	31,81 $\pm$ 0,15

^{A,B,C} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Já a temperatura média da superfície escrotal no período da tarde (Tabela 10) não apresentou efeito de tratamento ($p=0,15$), porém teve efeito de tempo ($p=0,0007$).

Tabela 10 – Média $\pm$ erro padrão da temperatura média da superfície escrotal (TMSE T, °C) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4, no período vespertino

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	-	-	-
S+1	33,88 $\pm$ 0,32	34,38 $\pm$ 0,18	34,13 $\pm$ 0,19 ^{AB}
S+2	34,45 $\pm$ 0,40	34,36 $\pm$ 0,25	34,41 $\pm$ 0,23 ^A
S+3	33,41 $\pm$ 0,41	33,84 $\pm$ 0,18	33,63 $\pm$ 0,22 ^B
S+4	32,98 $\pm$ 0,20	33,38 $\pm$ 0,31	33,18 $\pm$ 0,18 ^B
MÉDIA	33,68 $\pm$ 0,19	33,99 $\pm$ 0,13	33,84 $\pm$ 0,11

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Considerando as características da ultrassonografia no modo-B, a ecotextura testicular (ETT) (Tabela 11) não apresentou efeito de tratamento ($p=0,83$), somente efeito de tempo ($p=0,05$) apresentando assim maior heterogeneidade na semana 4.

Tabela 11 – Média $\pm$ erro padrão da ecotextura do parênquima testicular (ETT, 0 - 2) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	0,18 $\pm$ 0,18	0,06 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,09 ^B
S+1	0,18 $\pm$ 0,13	0,18 $\pm$ 0,13	0,18 $\pm$ 0,08 ^B
S+2	0,12 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,16	0,18 $\pm$ 0,10 ^B
S+3	0,18 $\pm$ 0,13	0,37 $\pm$ 0,18	0,28 $\pm$ 0,10 ^B
S+4	0,68 $\pm$ 0,24	0,50 $\pm$ 0,18	0,59 $\pm$ 0,15 ^A
MÉDIA	0,27 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,05

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Ainda no modo-B, a ecogenicidade testicular (EGT) foi similar entre os tratamentos e no decorrer do tempo (Tabela 12).

Tabela 12 - Média $\pm$ erro padrão da média da característica ecogenicidade testicular (EGT, 0 - 3) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	0,12 $\pm$ 0,12	0,18 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,08
S+1	0,25 $\pm$ 0,16	0,18 $\pm$ 0,13	0,21 $\pm$ 0,10
S+2	0,37 $\pm$ 0,18	0,31 $\pm$ 0,20	0,34 $\pm$ 0,13
S+3	0,31 $\pm$ 0,16	0,25 $\pm$ 0,13	0,28 $\pm$ 0,10
S+4	0,31 $\pm$ 0,16	0,50 $\pm$ 0,23	0,40 $\pm$ 0,30
MÉDIA	0,27 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,05

Considerando as características da ultrassonografia no modo color-Doppler, observou-se uma tendência ($p=0,08$) do grupo INS em apresentar maior escore de vascularização do parênquima testicular (EVT) nas S+1 e S+3 ($p=0,08$) do que o grupo CON. Houve ainda o efeito de tratamento para o EVT ($p=0,0005$) em ser maior no grupo INS do que no CON (Tabela 13).

Tabela 13 - Média $\pm$ erro padrão do escore da vascularização do parênquima testicular (EVT, 0 - 4) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	2,43 $\pm$ 0,29	3,06 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,20
S+1	2,81 $\pm$ 0,28*	3,50 $\pm$ 0,23*	3,15 $\pm$ 0,19
S+2	2,81 $\pm$ 0,18	3,31 $\pm$ 0,28	3,06 $\pm$ 0,17
S+3	2,68 $\pm$ 0,18*	3,25 $\pm$ 0,25*	2,96 $\pm$ 0,16
S+4	2,50 $\pm$ 0,18	3,12 $\pm$ 0,27	2,81 $\pm$ 0,18
MÉDIA	2,65 $\pm$ 0,10 ^b	3,25 $\pm$ 0,11 ^a	2,95 $\pm$ 0,08

^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$). * na mesma linha indica tendência estatística ($p \leq 0,10$).

O escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) não apresentou efeito de tempo, porém teve efeito de tratamento ($p=0,05$). O grupo insulado apresentou menor vascularização do plexo pampiniforme do que o grupo controle, mas foram semelhantes ao longo do tempo (tabela 14).

Tabela 14 - Média $\pm$ erro padrão do escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP, 1 - 5) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	4,00 $\pm$ 0,21	3,68 $\pm$ 0,24	3,84 $\pm$ 0,16
S+1	4,06 $\pm$ 0,22	3,62 $\pm$ 0,26	3,84 $\pm$ 0,17
S+2	4,18 $\pm$ 0,24	3,81 $\pm$ 0,16	4,00 $\pm$ 0,15
S+3	3,93 $\pm$ 0,23	3,75 $\pm$ 0,29	3,84 $\pm$ 0,18
S+4	3,81 $\pm$ 0,23	3,68 $\pm$ 0,29	3,75 $\pm$ 0,18
MÉDIA	4,00 $\pm$ 0,09 ^a	3,71 $\pm$ 0,11 ^b	3,85 $\pm$ 0,07

^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Observou-se que o Índice de resistência (RIP) não apresentou efeito de tratamento ($p=0,48$), mas o grupo INS apresentou efeito de tempo ($p=0,02$). O RIP diminuiu a partir da semana 3 (S+3) dentro do grupo insulado, além do mais, a mesma característica foi menor na semana 4 (S+4) no grupo dos animais insulados comparados com o grupo controle (Tabela 15).

Tabela 15 – Média $\pm$ erro padrão do índice de resistência do plexo pampiniforme (RIP, 0 - 1) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	0,59 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,03 ^A	0,60 $\pm$ 0,02
S+1	0,57 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,03 ^A	0,59 $\pm$ 0,02
S+2	0,61 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,04 ^{AB}	0,59 $\pm$ 0,02
S+3	0,55 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,03 ^B	0,52 $\pm$ 0,02
S+4	0,61 $\pm$ 0,03 ^a	0,49 $\pm$ 0,04 ^{Bb}	0,55 $\pm$ 0,03
MÉDIA	0,59 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

6.2.2 Características espermáticas

Na Tabela 16 é possível verificar que houve efeito de interação entre tempo e tratamento para motilidade total ($p=0,01$), defeitos maiores ($p=0,0003$), defeitos menores ($p=0,0002$), total de defeitos ($p<0,0001$) e alto potencial mitocondrial ($p=0,01$) e tendência para espermatozoides PIAIA ($p=0,07$).

Tabela 16 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas: motilidade total (MT), vigor (VG), defeitos maiores (DMAio), defeitos menores (DMen), defeitos totais (DTot), membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), membrana plasmática íntegra (PI), membrana acrossomal íntegra (AI) e alto potencial mitocondrial (AP) dos touros dos grupos controle (CON) e insulado (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Variáveis	CON (n=8)	INS (n=8)	Geral	Efeito de Trat.	Efeito de Tempo	Interação Trat. X Tempo
MT (%)	70,83 $\pm$ 1,26	61,38 $\pm$ 2,49	66,11 $\pm$ 1,49	0,001	0,19	0,01
VG (1-5)	3,07 $\pm$ 0,12	2,98 $\pm$ 0,08	3,03 $\pm$ 0,24	0,31	0,60	0,88
DMAio (%)	12,37 $\pm$ 3,67	32,59 $\pm$ 4,36	22,48 $\pm$ 3,06	<0,0001	0,51	0,0003
DMen (%)	1,55 $\pm$ 0,22	8,02 $\pm$ 1,50	4,78 $\pm$ 0,84	<0,0001	0,81	0,0002
DTot (%)	13,93 $\pm$ 3,72	40,61 $\pm$ 4,41	27,27 $\pm$ 3,25	<0,0001	0,63	<0,0001
PIAIA (%)	71,98 $\pm$ 2,36	58,30 $\pm$ 3,94	65,14 $\pm$ 2,41	0,01	0,11	0,07
PI (%)	72,93 $\pm$ 2,88 ^a	61,65 $\pm$ 4,38 ^b	67,43 $\pm$ 2,66	0,05	0,04	0,12
AI (%)	85,09 $\pm$ 2,79	83,17 $\pm$ 3,09	84,14 $\pm$ 2,07	0,06	0,14	0,32
AP (%)	77,79 $\pm$ 3,00	64,76 $\pm$ 3,96	71,36 $\pm$ 2,56	0,005	0,21	0,01

A motilidade apresentou efeito de tratamento ($p=0,001$), porém não apresentou efeito de tempo ($p=0,19$) (Tabela 17). Observou-se que o grupo INS apresentou menores percentuais de motilidade que o grupo CON nas S+3 e S+4.

Dentro do grupo INS notou-se efeito do tempo, sendo que menores percentuais foram observados nas S+2 e S+4.

Tabela 17 - Média $\pm$ erro padrão da motilidade total (MT, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	71,66 $\pm$ 1,66	70,62 $\pm$ 1,75 ^A	71,07 $\pm$ 1,19
S+1	69,37 $\pm$ 3,19	64,37 $\pm$ 5,12 ^{AB}	66,87 $\pm$ 2,98
S+2	70,00 $\pm$ 2,98	61,87 $\pm$ 3,52 ^B	65,93 $\pm$ 2,46
S+3	73,57 $\pm$ 2,60 ^a	65,00 $\pm$ 2,23 ^{Ab}	70,00 $\pm$ 2,13
S+4	70,00 $\pm$ 3,45 ^a	44,28 $\pm$ 7,74 ^{Cb}	57,14 $\pm$ 5,41
MÉDIA	70,83 $\pm$ 1,26	61,38 $\pm$ 2,49	66,11 $\pm$ 1,49

^{A,B,C} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O vigor espermático não apresentou efeitos de tratamento ($p=0,31$) e tempo ($p=0,60$). Os animais dos grupos controle e insulados apresentaram vigor semelhante durante todo o período experimental (Tabela 18).

Tabela 18 - Média $\pm$ erro padrão do vigor (VG, %) espermático dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	3,18 $\pm$ 0,24	3,12 $\pm$ 0,08	3,15 $\pm$ 0,12
S+1	3,25 $\pm$ 0,21	3,00 $\pm$ 0,26	3,12 $\pm$ 0,16
S+2	3,06 $\pm$ 0,23	3,06 $\pm$ 0,14	3,06 $\pm$ 0,13
S+3	3,25 $\pm$ 0,23	3,00 $\pm$ 0,18	3,13 $\pm$ 0,15
S+4	2,62 $\pm$ 0,41	2,71 $\pm$ 0,26	2,66 $\pm$ 0,24
MÉDIA	3,07 $\pm$ 0,12	2,98 $\pm$ 0,08	3,03 $\pm$ 0,24

Os percentuais de defeitos maiores (DMAio), menores (DMen) e total de defeitos apresentaram efeito de tratamento ($p < 0,0001$). Para os DMAio (Tabela 19) o grupo controle manteve-se constante durante todas as semanas de análises, já o grupo dos animais insulados apresentou aumento evidente a partir da S+2 até a S+4, diferindo significativamente em relação ao grupo CON.

Tabela 19 - Média $\pm$ erro padrão dos defeitos maiores (DMAio, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	15,48 $\pm$ 9,58	8,56 $\pm$ 1,88 ^B	11,79 $\pm$ 4,49
S+1	10,37 $\pm$ 6,26	15,31 $\pm$ 3,30 ^B	12,84 $\pm$ 3,47
S+2	13,12 $\pm$ 9,22 ^b	37,93 $\pm$ 7,88 ^{Aa}	25,53 $\pm$ 6,67
S+3	7,68 $\pm$ 4,95 ^b	55,42 $\pm$ 10,63 ^{Aa}	29,96 $\pm$ 8,34
S+4	16,07 $\pm$ 12,31 ^b	50,85 $\pm$ 10,34 ^{Aa}	33,46 $\pm$ 9,10
MÉDIA	12,37 $\pm$ 3,67	32,59 $\pm$ 4,36	22,48 $\pm$ 3,06

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O percentual de DMen encontrado no sêmen dos animais de testículos insulados foi maior estatisticamente em relação aos animais do grupo controle a partir da semana 1 (S+1) e manteve-se até a semana 4 (S+4) (Tabela 20).

Tabela 20 – Média $\pm$ erro padrão dos defeitos menores (DMen, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	2,78 $\pm$ 0,68	4,87 $\pm$ 1,46	3,90 $\pm$ 0,85
S+1	1,68 $\pm$ 0,58 ^b	10,06 $\pm$ 4,27 ^a	5,87 $\pm$ 2,34
S+2	1,12 $\pm$ 0,15 ^b	13,25 $\pm$ 4,84 ^a	7,18 $\pm$ 2,81
S+3	1,00 $\pm$ 0,29 ^b	5,21 $\pm$ 1,26 ^a	2,96 $\pm$ 0,81
S+4	1,28 $\pm$ 0,51 ^b	6,14 $\pm$ 2,48 ^a	3,71 $\pm$ 1,39
MÉDIA	1,55 $\pm$ 0,22	8,02 $\pm$ 1,50	4,78 $\pm$ 0,84

^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Quando comparados os dois grupos de tratamentos, em relação ao total de defeitos espermáticos (DTot), o grupo insulado apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle já na semana 1 (S+1), com uma diferença ainda maior na semana 2 (S+2), que manteve-se nas demais semanas (S+3 e S+4) (Tabela 21).

Tabela 21 – Média $\pm$ erro padrão dos defeitos totais (DTot, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	18,26 $\pm$ 9,70	13,43 $\pm$ 3,15 ^B	15,69 $\pm$ 4,68
S+1	12,06 $\pm$ 6,73 ^b	25,37 $\pm$ 5,40 ^{Ba}	18,71 $\pm$ 4,51
S+2	14,25 $\pm$ 9,28 ^b	51,18 $\pm$ 7,72 ^{Aa}	32,71 $\pm$ 7,53
S+3	8,68 $\pm$ 4,97 ^b	60,64 $\pm$ 10,08 ^{Aa}	32,93 $\pm$ 8,65
S+4	17,35 $\pm$ 12,32 ^b	57,00 $\pm$ 10,01 ^{Aa}	37,17 $\pm$ 9,40
MÉDIA	13,93 $\pm$ 3,72	40,61 $\pm$ 4,41	27,27 $\pm$ 3,25

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O percentual de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) apresentou efeito de tratamento ($p=0,01$). O grupo CON manteve-se constante durante as avaliações. No grupo INS observou-se uma queda no percentual de PIAIA desde a retirada da bolsa (D0) e nas semanas seguintes (S+1 a S+4), mas somente na S+4 que esse decréscimo foi significativo e menor em relação ao grupo CON (Tabela 22).

Tabela 22 – Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana plasmática intacta, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	64,25 $\pm$ 6,02	71,62 $\pm$ 3,81 ^A	67,93 $\pm$ 3,57
S+1	69,93 $\pm$ 5,36	61,25 $\pm$ 6,15 ^{AB}	65,59 $\pm$ 4,10
S+2	79,68 $\pm$ 3,13	64,12 $\pm$ 7,57 ^{AB}	71,90 $\pm$ 4,44
S+3	74,78 $\pm$ 5,64	52,71 $\pm$ 12,64 ^{AB}	63,75 $\pm$ 7,32
S+4	71,57 $\pm$ 5,50 ^a	38,64 $\pm$ 10,15 ^{Bb}	55,10 $\pm$ 7,18
MÉDIA	71,98 $\pm$ 2,36	58,30 $\pm$ 3,94	65,14 $\pm$ 2,41

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (PI) apresentou efeito de tratamento ($p=0,05$) e tempo ($p=0,04$) (Tabela 23). Notou-se maior percentual de PI para os animais do grupo CON do que para os do INS.

Tabela 23 - Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (PI, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	70,56 $\pm$ 5,94	79,25 $\pm$ 3,77	74,90 $\pm$ 3,58 ^A
S+1	72,56 $\pm$ 5,70	72,35 $\pm$ 3,89	72,46 $\pm$ 3,42 ^{AB}
S+2	82,25 $\pm$ 2,20	67,93 $\pm$ 7,77	75,09 $\pm$ 4,32 ^A
S+3	74,96 $\pm$ 5,43	53,85 $\pm$ 12,89	65,11 $\pm$ 7,00 ^{AB}
S+4	64,31 $\pm$ 10,29	35,25 $\pm$ 10,05	49,78 $\pm$ 7,89 ^B
MÉDIA	72,93 $\pm$ 2,88 ^a	61,65 $\pm$ 4,38 ^b	67,43 $\pm$ 2,66

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

O percentual de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (AI) não apresentou efeito de tempo ($p=0,14$), mas apresentou tendência ($p=0,06$) ao efeito de tratamento (Tabela 24).

Tabela 24 - Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (AI, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	79,93 $\pm$ 3,91	86,12 $\pm$ 1,66	83,03 $\pm$ 2,20
S+1	91,43 $\pm$ 2,06	82,56 $\pm$ 3,72	87,00 $\pm$ 2,35
S+2	91,68 $\pm$ 2,30	89,31 $\pm$ 5,36	90,50 $\pm$ 2,83
S+3	84,83 $\pm$ 5,84	78,70 $\pm$ 9,22	81,68 $\pm$ 5,19
S+4	77,56 $\pm$ 11,60	79,18 $\pm$ 11,50	78,37 $\pm$ 7,89
MÉDIA	85,09 $\pm$ 2,79	83,17 $\pm$ 3,09	84,14 $\pm$ 2,07

A porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (AP) apresentou efeito de tratamento ($p=0,005$), mas não de tempo ($p=0,21$). Dentro do grupo INS notou-se efeito de tempo, sendo este aumento evidenciado na S+4 (Tabela 25).

Tabela 25 – Média $\pm$ erro padrão do percentual de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (AP, %) dos touros dos grupos controle (CON) e insulados (INS) nos períodos D0 e S+1 a S+4

Semanas	Tratamentos		MÉDIA
	CON (n=8)	INS (n=8)	
D 0	72,93 $\pm$ 5,20	79,43 $\pm$ 4,41 ^A	76,43 $\pm$ 3,34
S+1	80,18 $\pm$ 5,55	69,37 $\pm$ 6,63 ^A	74,78 $\pm$ 4,40
S+2	87,56 $\pm$ 2,88 ^a	70,18 $\pm$ 6,97 ^{Ab}	78,87 $\pm$ 4,28
S+3	76,40 $\pm$ 6,64	65,35 $\pm$ 9,30 ^A	71,24 $\pm$ 5,59
S+4	71,87 $\pm$ 10,85 ^a	39,06 $\pm$ 10,29 ^{Bb}	55,46 $\pm$ 8,37
MÉDIA	77,79 $\pm$ 3,00	64,76 $\pm$ 3,96	71,36 $\pm$ 2,56

^{A,B} letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$); ^{a,b} letras minúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

6.2.3 Correlações entre as características ambientais e clínicas

Na Tabela 26 encontram-se as correlações ($p < 0,05$) entre as características ambientais (temperatura e umidade) e as características clínicas (temperaturas corporais, parâmetros vitais e características testiculares).

Tabela 26 – Correlações entre temperatura e umidade ambientais, temperaturas corporais, parâmetros vitais e características testiculares de touros da raça Nelore hígidos e com variados graus de degeneração testicular.

Variáveis	r	p
Temperatura Ambiente X Umidade Relativa	-0,803	<0,0001
Temperatura Ambiente X Temperatura Retal	0,645	<0,0001
Temperatura Ambiente X Temperatura Ocular	0,898	<0,0001
Temperatura Ambiente X Temperatura Média da Superfície Escrotal	0,781	<0,0001
Temperatura Ambiente X Frequência Respiratória	0,163	0,004
Umidade Relativa X Temperatura Retal	-0,485	<0,0001
Umidade Relativa X Temperatura Ocular	-0,706	<0,0001
Umidade Relativa X Temperatura Média da Superfície Escrotal	-0,541	<0,0001
Umidade Relativa X Frequência Respiratória	-0,172	0,0024
Umidade Relativa X Perímetro Escrotal	0,188	0,0009

Na Tabela 27 encontram-se as correlações ($p < 0,05$) entre as temperaturas corporais, parâmetros vitais e as características testiculares dos touros.

Tabela 27 – Correlações entre temperaturas corporais (termogramas), parâmetros vitais e características testiculares de touros da raça Nelore hígidos e com variados graus de degeneração testicular.

Variáveis	r	p
Temperatura Retal X Frequência Respiratória	0,206	0,0003
Temperatura Retal X Temperatura Ocular	0,646	<0,0001
Temperatura Retal X Temperatura Média da Superfície Escrotal	0,621	<0,0001
Temperatura Ocular X Frequência Respiratória	0,163	0,0047
Temperatura Ocular X Temperatura Média da Superfície Escrotal	0,78	<0,0001
Temperatura Média da Superfície Escrotal X Frequência Respiratória	0,195	0,0006

Na Tabela 28 encontram-se as correlações ($p < 0,05$) entre os parâmetros vitais e as características testiculares de touros.

Tabela 28 – Correlações entre parâmetros vitais e características testiculares de touros da raça Nelore hípidos e com variados graus de degeneração testicular.

Variáveis	r	p
Frequência Cardíaca X Frequência Respiratória	0,294	<0,0001
Ecotextura do parênquima testicular X Ecogenicidade do parênquima testicular	0,332	<0,0001
Ecotextura do parênquima testicular X Escore de vascularização do parênquima testicular	-0,274	<0,0001
Ecotextura do parênquima testicular X Escore de vascularização do plexo pampiniforme	-0,148	0,0096
Ecotextura do parênquima testicular X Índice de resistência	0,145	0,0106
Ecogenicidade do parênquima testicular X Escore de vascularização do parênquima testicular	-0,118	0,0385
Ecogenicidade do parênquima testicular X Escore de vascularização do plexo pampiniforme	-0,373	<0,0001
Ecogenicidade do parênquima testicular X Índice de resistência	0,365	<0,0001
Escore de vascularização do parênquima testicular X Escore de vascularização do plexo pampiniforme	0,245	<0,0001
Escore de vascularização do plexo pampiniforme X Índice de resistência	-0,174	0,0022

Discussão

7 DISCUSSÃO

Sabendo da importância do diagnóstico breve e preciso das doenças do aparelho reprodutor de bovinos, de forma que evite o agravamento da alteração para um quadro irreversível, foi investigada no presente estudo a eficiência da termografia e da ultrassonografia como ferramentas auxiliares no diagnóstico da degeneração testicular em touros da raça Nelore induzidos à alteração. Na termografia foram consideradas as temperaturas da superfície escrotal e temperatura da área de olho; já na ultrassonografia foram considerados, no modo B, ecotextura e ecogenicidade do parênquima testicular, e nos modos color e espectral, a hemodinâmica testicular (vascularização do parênquima testicular, plexo pampiniforme e índice de resistência).

Primeiramente os grupos de animais foram comparados antes da indução da degeneração testicular, por um período de duas semanas, denominado de nivelamento biológico, constituindo os tempos experimentais S-1 e S-2. Os animais foram avaliados quanto às características clínicas e espermáticas. Os grupos (CON e INS) foram semelhantes em grande parte das características, somente o vigor (VG) foi maior nos animais do grupo INS, mas mesmo assim apresentava valor dentro dos desejados para a seleção de touros para reprodução, descrito no manual do CBRA (2013).

A importância desse nivelamento antes da insulação é para comprovar que os animais partiram de um mesmo ponto em relação aos parâmetros clínicos e espermáticos e que após o insulto térmico, apresentaram diferenças significativas nas características analisadas como já observados em outros estudos, com touros das raças Holandesa (VOGLER ET AL., 1993), Simental (GARCIA, 2004; SOUZA, 2004), Holstein-Friesian e Belgian Blue (RAHMAN et al., 2011), além de outras espécies como carneiros (MUCCILO; BARNABE; BARNABE, 1974; ALVES et al., 2016) e javalis (PARRISH et al., 2017), utilizando o mesmo método de insulação testicular.

No período pós-insulação (D0, S+1, S+2, S+3 e S+4), foram observadas alterações nas características clínicas e espermáticas nos animais do grupo insulado (INS) comparados com o grupo controle (CON).

A frequência cardíaca (FC) não foi alterada em função da insulação térmica testicular e se manteve dentro dos valores preconizados para a espécie bovina de 60 a 80 bpm (FEITOSA et al., 2008) e também dentro do encontrado para animais da raça Nelore sob estresse térmico (FC=64,11 bpm) de acordo com Cardoso et al. (2015), provavelmente por se tratar de um insulto local e não sistêmico.

Segundo Titto (1998), temperaturas ambientais elevadas causam desconforto térmico nos bovinos, levando-os ao aumento da temperatura corpórea e consequentemente da frequência respiratória (FR), como também observado no estudo de Martello et al. (2016). Esse impacto fica evidente também em um estudo de Arruda e Pant (1985), no qual carneiros de pelagem de coloração diferente foram monitorados e expostos ao calor do ambiente, sendo que a FR dos animais de pelagem escura apresentou-se maior do que dos animais de pelagem clara, ficando evidente o fenômeno de absorção corpórea e o quanto o calor influencia esse parâmetro. Porém, no presente trabalho, as FR aferidas nas quatro semanas após a insulação escrotal não apresentaram linearidade em seus resultados, oscilando tanto em relação aos grupos de tratamento quanto no decorrer das semanas analisadas; acredita-se que este comportamento ocorreu em função do insulto causador do estresse térmico testicular ser realizado de forma local (escroto) e não sistêmica; além disso, todos os valores encontrados para tal característica nos animais do grupo CON e INS encontravam-se abaixo do limite da frequência respiratória (41 mrpm) relatada para a raça Nelore (CARDOSO et al., 2015).

O parâmetro de referência da temperatura retal (TR) em gado de corte fica entre 36,7 e 39,1°C (ROBERTSHAW, 2006) e a média considerada normal em animais da raça Nelore é de 38,87°C (CARDOSO et al., 2015). A TR média foi menor no dia da retirada da bolsa (D0) quando comparada com as demais semanas, porém todos os valores encontram-se dentro de um padrão de normalidade durante os cinco períodos de avaliações.

Em um estudo realizado por Lopes e colaboradores (2011), com animais da raça Nelore, observou-se que animais de 25,38±2,16 meses apresentam média de 34,34±2,17 centímetros de perímetro escrotal, e animais também do território brasileiro da mesma raça, mas com média de idade de 30,6 meses apresentam média de 33,1±2,4 cm de perímetro (CBRA, 2013). Os animais deste estudo apresentaram no início do experimento a média de idade de 31,31±6,06 meses, e ambos os grupos (CON e INS) apresentaram o perímetro escrotal condizente com

suas idades e maturidade sexual no período pré-insulação (S-2 e S-1); porém, após o insulto térmico, observou-se efeito de tratamento ($p=0,004$) para tal característica, sendo que o grupo dos animais insulados apresentou redução do perímetro já na primeira semana (S+1) comparado ao grupo controle.

A consistência testicular é uma avaliação clássica para a indicação do diagnóstico de degeneração testicular. Em bovinos é utilizada há muito tempo como observado em estudos de Foote e colaboradores (1977) e possui correlação com características espermáticas, pois, sua diminuição associa-se com redução na produção dos espermatozoides (COULTER; FOOTE, 1979) e com o aumento do número de espermatócitos e espermátides que sofreram degeneração (MÜLLER et al., 1992). Em animais insulados em experimento de Alves (2014), apesar de não apresentar diferença estatística, apresentou diminuição da CT. Neste trabalho foi utilizada a mesma técnica de avaliação e as consistências testiculares dos touros insulados apresentam-se menores, ou seja, mais flácidas no grupo dos animais insulados (INS) em relação ao grupo controle (CON) em todos os tempos (D0 até S+4) o que confirma a afirmação de Van Camp (1997) sobre a flacidez em casos de degeneração testicular; porém, a menor consistência apresentada na palpação do órgão foi no dia da retirada da bolsa insuladora testicular (D0), como já esperado, pelo fato do insulto ter sido local e durante 96 horas.

Depois do insulto térmico de 96 horas e a retirada da bolsa dos animais, deparou-se com valores maiores da temperatura média da superfície escrotal no período da manhã (TMSE M) nos animais do grupo INS. Por não serem observadas interações tempo e tratamento para TMSE, foram avaliados os efeitos de tratamento ($p=0,01$) e de tempo ($p<0,0001$) separadamente. Assim, os touros INS tiveram maiores valores da TMSE em relação aos touros CON, mas o dia da retirada da bolsa (D0) foi o momento que a TMSE apresentou o maior valor em relação a todos os outros tempos (S-2 a S+4), valores que concordam com estudo de Alves et al. (2016), no qual a TMSE também foi maior ($p<0,05$) nos carneiros com testículos insulados ($32,26 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$) do que nos animais do grupo controle ($30,58 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$), ou seja, o termógrafo foi eficiente em detectar o aumento da TMSE no grupo dos animais insulados no dia da retirada da bolsa (D0). No presente estudo, o aumento de $1,16^{\circ}\text{C}$ foi suficiente para induzir as alterações testiculares em touros da raça Nelore; enquanto que, no trabalho de Alves et al. (2016) foi relatado aumento de

1,68° C da TMSE de carneiros da raça White Dorper para causar alterações testiculares e do quadro espermático.

A TMSE está relacionada com a temperatura dos testículos (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988), comprovando assim que as bolsas de fato induziram a um quadro degenerativo, como observado em estudos de Vogler et al. (1993) e Pezzini et al. (2006) durante 48 horas de insulação; Austin, Hupp e Murphree (1961) durante 72 horas; Gabaldi (1999), Brito et al. (2003), Garcia (2004) e Souza (2004) durante 96 horas. A relação termograma e degeneração testicular fica evidente ainda no experimento de Lunstra e Coulter (1997), no qual os touros que apresentam os valores anormais da TMSE produzem sêmen com menor qualidade (menor porcentagem de cabeças, caudas e acrossomos normais e maior porcentagem de gotas proximais). A motilidade e o vigor do sêmen também diminuíram sob influência do calor (verão) (MENEGASSI et al., 2014). A TMSE no período vespertino (TMSE T) também apresentou variações similares ao período matutino, mas como esperado valores um pouco maiores.

Além da temperatura escrotal, a ecotextura do parênquima testicular (ETT) é importante e está relacionada com a constituição normal do parênquima testicular, incluindo proliferação celular, espermatogênese, produção de fluídos nos testículos e túbulos seminíferos, que ocorre durante o desenvolvimento reprodutivo dos machos (CHANDOLIA et al., 1997; GÁBOR et al., 1998). Normalmente o desenvolvimento cessa na puberdade como sugerido por estudos de Brito e colaboradores (2002) e de Ahmad e colaboradores (2011) que observaram que o número de pixels do parênquima testicular no modo-B na ultrassonografia (ecotextura) dos bovinos aumenta até os 24 meses de idade e estabiliza-se a partir de então. Os animais avaliados neste estudo apresentaram o parênquima testicular homogêneo antes da insulação (CON = $0,17 \pm 0,09$ e INS = $0,18 \pm 0,08$), o que condiz também com a idade média dos mesmos ($31,31 \pm 6,06$ meses). Por outro lado, de acordo com Ahmad e Noakes (1995), animais que possuem quadro de degeneração testicular apresentam a imagem ultrassonográfica com aspecto heterogêneo, e no caso deste estudo, notou-se aumento gradativo da heterogeneidade no grupo dos animais INS a partir da segunda semana (S+2) até a quarta semana pós-insulação (S+4), verificado pela maior ecotextura da imagem do parênquima. No entanto, no grupo controle a ecotextura manteve-se constante durante todo o período avaliado, mas foi notado aumento da ecotextura somente na quarta semana (S+4), em função

de alteração do parênquima testicular de um dos touros do grupo. Apesar do grupo INS na S+4 apresentar valor quase três vezes maior que as semanas de nivelamento biológico, ela não apresentou diferença significativa, conforme Arteaga, Barth e Brito (2005) que observaram que a média de intensidade de pixels das imagens ultrassonográficas no testículo diminuiu entre a segunda e a terceira semana pós insulação escrotal (tornando-se mais heterogêneo), este achado coincide também com a diminuição da motilidade e aumento das células morfológicamente anormais nos touros do grupo INS.

A ultrassonografia no modo B mostra que o testículo deve apresentar ecotextura homogênea e baixa a moderada ecogenicidade (BRITO et al., 2015), como também observado por Cardilli et al. (2012) em um estudo com bovinos da raça Nelore. Em caso de alta ecogenicidade, o rastreio pela ultrassonografia pode detectar em grande parte dos casos, a microlitíase (microcalcificações) (HOLM et al., 2001). Em humanos, a presença de mais de cinco pontos de calcificação por campo visualizado já é considerado anormal (DOGRA et al., 2003).

Neste estudo, os animais dos grupos CON e INS apresentavam baixa ecogenicidade antes da insulação testicular ($0,14 \pm 0,08$ e $0,21 \pm 0,12$, respectivamente) e pós-insulto continuaram com a mesma característica, sem diferença significativa entre os grupos durante as quatro semanas de avaliações (CON= $0,27 \pm 0,06$; INS= $0,28 \pm 0,07$). Valores que contradizem com os do estudo de Ahmad e Noakes (1995) que ultrassonograficamente mostrou que bodes acometidos pela degeneração testicular, confirmada por exames histológicos (post mortem), apresentavam o parênquima testicular heterogêneo, hiperecogênico e com sombreamento acústico. Uma explicação plausível é que esses animais tinham histórico de baixa fertilidade, ou seja, já há muito apresentavam a DEG (crônica) e neste estudo os animais apresentam baixa ecogenicidade antes e após o insulto, evidenciando que quatro semanas não são suficientes para aumentar a ecogenicidade do parênquima, e assim fazer um diagnóstico mais fidedigno da afecção, pelo processo de calcificação (mineralização) ser mais lento e até mesmo pelo fato do insulto ser de 96 horas e em seguida retirar-se a causa da indução da degeneração.

O fluxo sanguíneo é crucial para o funcionamento do órgão (POZOR, 2007), pois é a principal via de transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e produtos de secreção para os testículos, necessários para a espermatogênese. Qualquer

fenômeno que induza a isquemia (ZELLI et al., 2013) altera os mecanismos de termorregulação e ocorre deterioração da espermatogênese (KUTZLER et al., 2011).

Em estudo de Bergh, Collin e Lissbrant (2001) com ratos adultos, observaram-se que a redução no fluxo sanguíneo afeta a morfologia testicular e os túbulos seminíferos. Neste trabalho, pela ultrassonografia no modo color-Doppler, observou-se uma tendência ($p=0,08$) do grupo INS em apresentar maior escore de vascularização do parênquima testicular (EVT) nas S+1 e S+3 ($p=0,08$) do que o grupo CON. Este aumento ocorre porque no processo degenerativo há a necessidade de um maior aporte sanguíneo (oxigenação e nutrientes) na região para que as funções celulares sejam reestabelecidas; porém, nos animais insulados o escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) foi menor ($p=0,05$), contrariando a afirmação acima.

O índice de resistência (RIP) no presente estudo foi mensurado na região do plexo pampiniforme, pois em estudos com diversas espécies, a artéria testicular é melhor visualizada no cordão espermático, local onde localiza-se o plexo pampiniforme (GUMBSCH; GABLER; HOLZMANN, 2002; BATISSACO et al., 2013).

O aumento do índice de resistência vascular leva a uma menor passagem de células sanguíneas pela parede do vaso e, conseqüentemente, a uma menor vascularização do tecido o qual esse vaso irriga e o inverso é verdadeiro, como observado. No presente trabalho, o índice de resistência (RIP) do grupo INS apresentou queda na S+4, provavelmente pela necessidade de maior oxigenação e aporte de nutrientes, a fim de reestabelecer a função normal das células.

Estudos realizados em homens saudáveis e com varicocele, mostraram que o RIP era maior nos indivíduos acometidos pela afecção ($p<0,05$) (BIAGIOTTI et al., 2002). Em outro estudo realizado por Pinggera et al. (2008), com 160 homens, sendo 80 deles com contagem de espermatozoides normais e a outra metade com oligoastenozoospermia leve, observou-se que o grupo afetado pela alteração mostrava o valor de RIP acima de 0,6.

Outra característica clássica avaliada em situações de exposição do animal ao calor é a motilidade espermática (MT). Antes do insulto térmico no escroto dos touros, a média da motilidade total dos grupos CON e INS eram respectivamente $68,23\pm 2,05\%$ e $70,31\pm 2,11\%$ nas duas semanas que se antecederam a colocação da bolsa testicular (S-2 e S-1), ou seja, ambos os grupos apresentavam valores

maiores que os aconselhados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para a seleção de touros (CBRA, 2013) o qual preconiza tal característica mínima de 60%.

A MT apresenta-se diminuída no sêmen de touros, em situações de exposição a altas temperaturas como, por exemplo, no verão (MENEGASSI et al., 2014) e começa a se estabilizar quando a temperatura torna a diminuir, como demonstrado em estudos de Casady, Myers e Legates (1953) e de Barth e Bowman (1994) com taurinos e Brito e colaboradores (2003) com zebuínos. Neste estudo, o grupo INS apresentou valores inferiores aos do grupo CON, desde a primeira semana após a insulação testicular (S+1), com decréscimo na segunda e terceira (S+2 e S+3), porém, ficou mais evidente esse decréscimo principalmente na quarta semana (28 dias) após o insulto térmico, valores que corroboram os resultados encontrados por Brito et al. (2003) em estudo com touros induzidos à degeneração testicular pelo uso da bolsa insuladora por 96 horas, no qual a MT do sêmen dos touros com testículos insulados foi menor ($p<0,05$) comparado ao grupo controle e após a indução da degeneração já no D-21, permanecendo até o D-31 e com a maior diferença entre os grupos no D-24. Neste estudo, não realizou-se as avaliações no dia 24 após a insulação como no experimento de Brito et al. (2003), mas sim no D-28 (S+4) e foi nesta avaliação que ocorreu a maior queda da MT e pode-se comparar com o D-27 dos resultados de Brito (2003). Este (D-27) foi o segundo menor valor de motilidade depois do D-24. Os dados também condizem com os resultados obtidos por Souza (2004), no qual a MT do sêmen de touros, diminuiu significativamente já na segunda semana (S+2) pós-insulação e teve o pico de decréscimo na quarta semana (S+4) pós-insulação.

O vigor (VG) não manifestou efeitos de tratamento ($p=0,31$) e tempo ($p=0,60$), apresentando-se semelhantes em ambos os grupos durante todo o período experimental, valores que contrariam os achados de Meyerhoeffer et al. (1985) que após a quarta semana do estresse térmico, o VG diminui. Porém, o mesmo é uma característica subjetiva e os resultados encontrados apresentam-se todos próximos aos valores médios recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

No período de nivelamento biológico os defeitos espermáticos menores e totais de ambos os grupos estavam dentro dos valores recomendados pelo CBRA (2013), e o defeito maior do grupo CON ($11,62\pm 5,28\%$) estava próximo do recomendado pelo mesmo Colégio, inclusive o grupo dos animais INS apresentava

valores menores que os animais do grupo CON e após a insulação notou-se aumento nestes defeitos no grupo INS ($p < 0,0001$).

Para os defeitos maiores (DMAio), menores (DMen) e defeitos totais o grupo controle manteve-se constante durante todas as semanas de análises. Já o grupo dos animais insulados apresentou aumento evidente em DMAio a partir da S+2 até a S+4, diferindo significativamente em relação ao grupo CON, com um pico na terceira semana pós-insulto (21 dias), resultado muito parecido com achados de Vogler et al. (1993) que encontraram esse aumento no 18º dia pós-insulto e de Garcia (2004) que apresentou o mesmo pico no 23º dia após a insulação testicular.

Por outro lado, o grupo INS apresentou aumento evidente de DMen a partir da S+1 e com aumento maior quatorze dias após o estresse, decaindo nas próximas semanas, resultado bem parecido com estudo de Garcia (2004) com touros Simental, no qual o pico dos DMen foi no 9º dia após o insulto e também recuou nas demais semanas. Como consequência dos resultados dos DMAio e DMen, os valores dos defeitos totais tiveram um acréscimo em seus resultados já no D0 e S+1. Na S+2 houve um aumento de 101,7% em relação a semana anterior (de $25,37 \pm 5,40$ para $51,18 \pm 7,72\%$) para tal característica nos animais insulados e um pico na S+3, resultado que corrobora os achados em Simental induzidos à degeneração testicular, no qual o pico para tal característica foi na terceira semana após o estresse (SOUZA, 2004). Em estudo clássico de Vogler et al. (1993) com touros da raça Holandesa observou também o aumento de defeitos espermáticos no 18º dia após a retirada das bolsas insuladoras.

Em relação ao percentual de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) o grupo CON manteve-se constante durante as avaliações e o INS apresentou queda no percentual desde a retirada da bolsa até quatro semanas após, sendo que nesta última semana o decréscimo foi significativo em relação ao grupo CON. Esses resultados concordam em parte com os achados de Garcia (2004) com touro e de Alves (2014) com carneiros. Garcia (2004) encontrou decréscimo na população PIAIA em sêmen de touros insulados dois dias após a insulação, que manteve-se até a sétima semana após o estresse, e a maior queda para tal característica foi na segunda semana após a retirada das bolsas insuladoras. Já Alves (2014) também relatou a redução significativa ($p < 0,05$) para tal característica após a insulação testicular nos espermatozoides dos carneiros do

grupo INS, mas o menor valor encontrado foi no 17º dia após o insulto, sendo que no presente estudo a diminuição foi significativa com os touros da raça Nelore do grupo INS após o 28º dia. A membrana plasmática íntegra (PI) apresentou efeito de tempo ($p=0,04$) e tratamento ($p=0,05$), com percentual de PI maior para os animais do grupo CON comparados aos do grupo INS. O decréscimo da PI iniciou na S+1 e a maior queda foi na S+4 (28 dias pós-insulto), resultado bem parecido nos achados de Garcia (2004), que encontrou o maior decréscimo no 23º dia após a retirada das bolsas. Entretanto, não foram notados efeitos da INS sobre o percentual de integridade de acrossomo, estes achados corroboram os resultados dos animais insulados de Alves (2014). Já o percentual de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (AP) caiu durante todas as semanas no grupo INS, com o menor valor encontrado na quarta semana de avaliação.

O monitoramento das condições ambientais realizado durante todo o período do experimento produziu dados importantes, que podem revelar variações que refletem nos parâmetros vitais e oscilações de temperaturas corporais obtidas pelo termograma dos touros. A correlação negativa entre temperatura ambiental e umidade relativa do ar ($r=-0,803$; $p<0,0001$), era esperada, pois de acordo com Barry e Chorley (2012) a umidade relativa do ar varia inversamente com a temperatura, e tende a ser mais baixa no começo da tarde.

O aumento da temperatura ambiental pode causar mudanças homeostáticas que podem ser observadas pela aferição de parâmetros fisiológicos. Quando há o aumento da temperatura do ambiente ocorre também o acréscimo da frequência respiratória em bovinos (DUNLAP; VICENT, 1971). No presente estudo, a temperatura ambiental correlacionou-se positivamente com a temperatura retal ($r=0,645$; $p<0,0001$) e frequência respiratória ($r=0,163$; $p=0,004$), concordando com trabalho de Ferreira et al. (2006), no qual bovinos que foram expostos ao estresse calórico controlado tiveram acréscimo na temperatura retal e FR (taquipneia) até sete vezes maiores do que inicialmente (BARROS et al., 2009).

As temperaturas ambientais também influenciam na temperatura média da superfície escrotal ($p<0,0001$) segundo estudo de Barros e colaboradores (2009), tal influência também foi correlacionada positivamente neste experimento ($r=0,781$; $p<0,0001$). Por outro lado, a umidade relativa do ar apresentou correlação negativa com temperatura retal, temperatura ocular, TMSE e FR, isso se explica pelo fato da

umidade relativa do ar ser inversamente proporcional a temperatura do ambiente (BARRY; CHORLEY, 2012).

O aumento do consumo de O_2 (FR) também está intimamente correlacionado com o aumento da frequência cardíaca (FC) (MONTEIRO; FILHO, 2004), ou seja, bovinos menos estressados tendem a manterem-se próximos aos parâmetros fisiológicos normais e touros mais estressados, como no estresse calórico, tendem a aumentar esses dois parâmetros (TITTO, 2006), no presente estudo observamos essa oscilação com uma correlação positiva ($r=0,294$; $p<0,0001$). Apesar de se notar correlação significativa ($p=0,0006$) entre FR e TMSE esta foi baixa ($r=0,195$), fato que contraria os resultados obtidos por Alves e colaboradores (2016) que não encontraram correlação entre as características.

Em bovinos o aumento da temperatura ocular pode estar associado a diversos motivos, entre eles, o estresse (STEWART et al., 2008), assim aumentando a temperatura ambiente, eleva a temperatura retal que é correlacionada positivamente com a temperatura ocular de bovinos ($r=0,675$; $p=0,002$) (FERRAZ, 2017). Essa correlação entre temperatura retal e ocular ($r=0,59$; $p<0,0001$) e entre retal e TMSE ($r=0,17$; $p=0,01$) foram positivas em estudo com carneiros (ALVES et al., 2016) e ocorreu neste trabalho com bovinos entre temperatura retal e temperatura ocular ($r=0,646$; $p<0,0001$) e temperatura retal com TMSE ($r=0,621$; $p<0,0001$). Barros et al. (2016) também encontraram correlação entre temperatura ocular e retal ($r=0,58$; $p<0,0001$) em touros bubalinos.

A temperatura retal correlacionou-se positivamente com a frequência respiratória ($r=0,206$; $p=0,0003$), corroborando os achados de Ferreira et al. (2006) com bovinos e os de Alves et al. (2016) com carneiros.

Ao se avaliar a relação entre os achados ultrassonográficos testiculares, notou-se correlação positiva entre a ecotextura do parênquima testicular (ETT) e a ecogenicidade (EGT) do mesmo ($r=0,332$; $p<0,0001$), o que pode ser explicado pelo fato de animais saudáveis apresentarem como característica natural o parênquima homogêneo e moderadamente ecogênico (PECHMAN; EILTS, 1987; RIBADU e NAKAO, 1999), e machos acometidos por degeneração apresentarem parênquima com aspecto mais heterogêneo e dependendo do grau da alteração, podem ser visualizados pontos hiperecóticos (ARTEAGA; BARTH; BRITO, 2005; AHMADI, et al., 2012). Já a ecogenicidade do parênquima testicular (EGT) foi correlacionada negativamente com o escore de vascularização do parênquima (EVT) ($r=-0,118$;

$p=0,0385$) e com o escore de vascularização do plexo pampiniforme (EVP) ($r=-0,373$; $p<0,0001$), pois animais com os testículos saudáveis (moderadamente hiperecóicos) apresentam menos fluxo sanguíneo, e consequentemente correlação positiva com o índice de resistência ($r=0,365$; $p<0,0001$) comparado aos animais que sofreram degeneração testicular. Foi encontrada ainda correlação negativa entre a ETT e o escore de vascularização do parênquima ($r=-0,274$; $p<0,0001$), o que mostra que quanto mais homogêneo o parênquima menor a necessidade de um aporte sanguíneo e o inverso também é verdadeiro, pois em casos de DEG aumenta-se o fluxo sanguíneo no órgão. Embora tenha sido observada correlação negativa significativa ($p=0,00096$) entre ETT x escore de vascularização do plexo pampiniforme o valor foi muito baixo ($r=-0,148$) não permitindo afirmar haver esta relação; além disso, notou-se que após o estresse térmico diminuiu o fluxo sanguíneo no plexo pampiniforme dos animais que sofreram o insulto. Resultado semelhante foi notado entre ETT e o RIP, no qual se encontrou correlação positiva, mas muito baixa ($r=0,145$; $p=0,0106$). Este achado pode ser explicado considerando que animais saudáveis apresentam menor fluxo sanguíneo para o órgão e consequentemente é maior o índice de resistência dos vasos, já os animais acometidos pela degeneração podem apresentar maior irrigação do órgão e consequentemente menor RIP. A ecotextura do parênquima tende a ficar mais homogênea conforme a maturidade sexual se aproxima, quando ocorre a diminuição da quantidade de sangue no local e aumento do RIP, porém estudos com meninos pós-púbere apresentaram um menor RIP comparado com os pré-púbere (PALTIEL; RUPICH, BABCOCK, 1994).

Notou-se correlação positiva entre EVT e EVP ($r=0,245$; $p<0,0001$), este segundo aumenta seu escore em casos de insulto térmico, para realizar a troca de calor mais eficiente, e também aumenta o escore do parênquima. Além disso, observou-se que quando se aumenta o escore de vascularização do plexo pampiniforme ocorre a diminuição do RIP ($r=-0,174$; $p=0,0022$), pois ambas são inversamente proporcionais como observado por Trudinger et al. (1985) e Krishna e Bhalerao (2011).

---

conclusão

8 CONCLUSÃO

O estresse térmico, induzido pelo uso de bolsas insuladoras testiculares em touros, provoca um quadro de degeneração testicular, caracterizado por redução na consistência testicular e alteração nas características espermáticas, com redução da motilidade, integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial, além de aumento de espermatozoides com defeitos morfológicos.

Este quadro é acompanhado pelo aumento da temperatura média da superfície escrotal somente no dia da retirada das bolsas, provoca heterogeneidade e aumento da vascularização do parênquima testicular, reduz a vascularização e o índice de resistência dos vasos do plexo pampiniforme.

Em touros com degeneração testicular as características ambientais (temperatura e umidade), parâmetros vitais, termodinâmica, hemodinâmica testicular e espermograma relacionam-se entre si, bem como entre as características espermáticas e os achados da termodinâmica e ultrassonografia testicular.

REFERÊNCIAS

- ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne). **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. São Paulo, jan/2017 – fev/2017. p. 1-16. Disponível em: < <http://abiec.com.br/download/Anual%20jan%20a%20fev%202017.pdf> >. Acesso em: 16 mar. 2017.
- AHMAD, N.; NOAKES, D. E.; SUBANDRIO, A. L. B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. **The Veterinary Record**, v. 128, n. 21, p. 491-495, 1991.
- AHMAD, N.; NOAKES, D. E.; MIDDLETON, D. J. Use of ultrasound to diagnose testicular degeneration in a goat. **The Veterinary Record**, v. 132, n. 17, p. 436-439, 1993.
- AHMAD, N.; NOAKES, D. E. Ultrasound imaging in determining the presence of testicular degeneration in two male goats. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 1, p. 101-110, 1995.
- AHMAD, E.; AHMAD, N.; NASEER, Z.; ALEEM, M.; KHAN, M. S.; ASHIQ, M.; YOUNIS, M. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 1, p. 159-164, 2011.
- AHMADI, B.; LAU, C. P.; GIFFIN, J.; SANTOS, N.; HAHNEL, A.; RAESIDE, J.; CHRISTIE, H.; BARTLEWSKI, P. Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. **Experimental Biology and Medicine**, v.237, n. 2, p. 186-193, 2012.
- AILUGAMI, A.; VON PÜCKLER, K.; WEHREND, A.; SICKINGER, M. Sonography of the distal urethra in lambs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 59, p. 1-4, 2017.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 204-209, dez. 2009.
- ALVES, M. B. R. **Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade**. 2014. 166f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2014.
- ALVES, M. B. R.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; OLIVEIRA, B. M. M.; TORRES, M. A.; LANÇONI, R.; RAVAGNANI, G. M.; FILHO, R. R. P.; VELLONE, V. S.; LOSANO, J. D. A.; FRANCI, C. R.; NICHI, M. CELEGHINI, E. C. C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on

seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, p. 795-895, 2016.

AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis testicular germ cell degeneration. **The American Journal of Anatomy**, v. 110, p. 69-78, 1962.

ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M.; RAPHAEL, C.F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.

ARRUDA, F. A. V.; PANT, K. P. Frequência respiratória em caprinos pretos e brancos de diferentes idades. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 11, p. 1351-1354, 1985.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2000.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIME, J. D.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

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

ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). **Index ASBIA Mercado 2014**. Uberaba/MG, 2014. p. 1-30. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>>. Acesso em 17 abr. 2017.

AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R. L. Effect of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 307-310, 1961.

BARROS, C. M. Q.; OBA, E.; SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; KASTELIC, J. P. Efeito da temperatura ambiente sobre as temperaturas escrotal, intratesticular, intravascular e fluxo sanguíneo testicular de touros. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p.354-362, 2009.

BARROS, D. V.; SILVA, L. K.; LOURENÇO JR, J. B.; SILVA, A. O.; SILVA, A. G.; FRANCO, I. M.; OLIVEIRA, C. M. C.; THOLON, P.; MARTORANO, L. G.; GARCIA, A. R. Evaluation of thermal comfort, physiological, hematological, and seminal features of buffalo bulls in an artificial insemination station in a tropical environment. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 5, p. 805-813, 2015.

BARROS, D. V.; SILVA, L. K. X.; KAHWAGE, P. R.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; SOUSA, J. S.; SILVA, A. G. M.; FRANCO, I. M.; MARTORANO, L. G.; GARCIA, A. R. Assessment of surface temperatures of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) raised under tropical conditions using infrared thermography, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 422-430, 2016.

BARRY, R. G.; CHORLEY, R. J. *Atmosfera, Tempo e Clima*. 9.ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. p. 82.

BARTH, A. D.; OKO R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1 ed. Iowa, USA: Iowa State University Press, 1989. p. 3-6.

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, n. 2, p. 93-102, 1994.

BARTH, A. D.; ALISIO, L.; AVILÉS, M.; ARTEAGA, A. A.; CAMPBELL, J. R.; HENDRICK, S. H. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 3-4, p. 274-288, 2008.

BATISSACO, L.; CELEGHINI, E. C. C.; PINAFFI, F. L. V.; OLIVEIRA, B. M. M.; ANDRADE, A. F. C.; SERRANO-RECALDE, E. C.; FERNANDES, C. B. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, p. 384-395, 2013.

BEHRE, H. M.; KLIESCH, S.; SCHÄDEL, F.; NIESCHLAG, E. Clinical relevance of scrotal and transrectal ultrasonography in andrological patients. **International Journal of Andrology**, v. 18, p. 27-31, 1995.

BERGH, A.; COLLIN, O. LISSBRANT, E. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 13-20, 2001.

BIAGIOTTI, G.; CAVALLINI, G.; MODENINI, F.; VITALI, G.; GIANAROLI, L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. **British Journal of Urology International**, v. 90, n. 9, p. 903-908, 2002,

BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 43-48, jul/dez/ 2007.

BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweet glands of scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673-677, 1988.

BODDY, K.; ROBINSON, J. S. External method for detection of fetal breathing in utero. **Lancet**, v. 198, n. 7736, p. 1231-1233, 1971.

BRASIL, 2014. **Produto Interno Bruto da agropecuária deve ser de R\$ 1,1 trilhão**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/12/produto-interno-bruto-do-setor-deve-ser-de-r-1-1-trilhao>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

BRASIL, 2016. **Agronegócio deve ter crescimento de 2% em 2017**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/12/agronegocio-deve-ter-crescimento-de-2-em-2017>>. Acesso em 23 mar. 2017.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A. G.; KASTELIC, J. P. Effect of age genetic group characteristics of scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Theriogenology**, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, 2003.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 511-528, 2004.

BRITO, M.; FELICIANO, M.; COUTINHO, L. N.; USCATEGUI, R. R.; SIMÕES, A.; MARONEZI, M. C.; DE ALMEIDA, V. T.; CRIVELARO, R. M.; GASSER, B.; PAVAN, L.; RUSSIANO, W. R. Doppler and contrast-enhanced ultrasonography of testicles in adult domestic felines. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 730-734, 2015.

CAMPOS, I. S.; DE SOUZA, G. N.; PINNA, A. E.; FERREIRA, A. M. R. Transrectal ultrasonography for measuring of combined utero-placental thickness in pregnant Mangalarga Marchador mares. **Theriogenology**, v. 96, p. 142-144, 2017.

CAPRARO, G. A.; COUGHLIN, B. F.; MADER, T. J.; SMITHLINE, H. A. Testicular cooling associated with testicular torsion and its detection by infrared thermography: an experimental study in sheep. **The Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2688-2693, dez. 2008.

CARAZO, L. R. B.; GUIMARÃES, J. D.; MACHADO, T. P.; MACHADO, T. P. L. C.; OLIVEIRA, F. A. S. A. M.; PEREIRA, D. B. Ultrassonografia testicular em caprinos jovens da raça Alpina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 388-394, 2014.

CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H.; PASTORE, A. A.; CANOLA, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; MERCADANTE, M. E. Z. Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 75-82, 2012.

CARDOSO, C. C.; PERIPOLLI, V.; AMADOR, S. A.; BRANDÃO, E. G.; ESTEVES, G. I. F.; SOUZA, C. M. Z.; FRANÇA, M. F. M. S.; GONÇALVES, F. G.; BARBOSA, F. A.; MONTALVÃO, T. C.; MARTINS, C. F.; NETO, A. M.; MCMANUS, C.

Physiological and thermographic response to heat stress in zebu cattle. **Livestock Science**, v. 182, p. 83-92, 2015.

CARRILLO, J. D.; SOLER, M.; LUCAS, X.; AGUT, A. Colour and pulsed Doppler ultrasonographic study of the canine testis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 655-659, 2012.

CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia em Pequenos Animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 2, 6.

CASADY, R. B.; MYERS, R. M.; LEGATES, J. E. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal Dairy Science**, v. 36, n. 1, p. 14-23, 1953.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M.; BATISSACO, L.; PINTO, S. C. C.; GONZAGA, V. H. G.; NOGUEIRA, V. J. N.; GARCIA-OLIVEROS, L. N.; ALMEIDA, F. S. Degeneração testicular: visão científica. **Revista Agropecuária Brasileira**, [Epub ahead of print], 2017.

CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B. C.; PIERSON, R.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v. 48, p. 119-132, 1997.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2013. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. p. 16, 17, 71, 81-82.

COELHO, L.A.; SASA, A.; NADER, C. E.; E. C. C. CELEGHINI. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 4, p. 544-549, 2006.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v. 41, p. 653-667, 1993.

CORRÊA, A. B.; VALE FILHO, V. R.; CORRÊA, G. S. S.; ANDRADE, V. J.; SILVA, M. A.; DIAS, J. C. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 823-830, 2006.

COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**, v. 11, n. 4, p. 297-311, 1979.

COULTER, G. H.; BAILEY, D. R. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 743-749, 1988.

COULTER, G. H.; SENGER, P. L.; BAILEY, D. R. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p.417-423, 1988.

COULTER; G. H.; COOK, R. B.; KASTELIC, J. P. Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 4, p. 1048-1052, 1997.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (HAF) in the mare. **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 514-524, 2012.

DELVENTO, V. R.; AMANN, R. P.; TROTTER, G. W.; VEERAMACHANENI, D. N.; SQUIRES, E. L. Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p. 2094-2101, 1992.

DOGRA, V. S.; GOTTLIEB, R. H.; OKA, M.; RUBENS, D. J. Sonography of the scrotum. **Radiology**, v. 227, n. 1, p. 18-36, 2003

DUDEA, S. M.; CIUREA, A.; CHIOREAN, A.; BOTAR-JID, C. Doppler applications in testicular and scrotal disease. **Medical Ultrasonography**, v. 12, n. 1, p. 43-51, 2010.

DUNLAP, S. E.; VINCENT, C. K. Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 6, p. 1216-1218, 1971.

ELMETWALLY, M.; ROHN, K.; MEINECKE-TILLMANN, S. Noninvasive colo Doppler sonography of uterine blood flow throughout pregnancy in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1070-1079, 2016.

EMBRAPA, 2011. Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/sistemaproducao/>>. Acesso em 21 ago. 2017.

EVANS, A. C.; PIERSON, R. A.; GARCIA, A.; MCDUGALL, L. M.; HRUDA, F.; RAWLINGS, N. C. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 345-357, 1996.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 735.

FERNANDES, C. E.; DOBE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its

relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-1568, 2008.

FERRAZ, C. M. F. M. **A termografia em medicina veterinária: aplicação em bovinos de raça de lide**. 2017, 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

FERREIRA, F.; PIRES, M. F. A.; MARTINEZ, M. L.; COELHO, S. G.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, P. M.; FACURY FILHO, E. J.; CAMPOS, W. E. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.

FONSECA, V. O.; CRUDELI, G. A.; COSTA E SILVA, E. V. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) em monta natural: proporção touro:vaca 1:40 e fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, p.103-108, 1991.

FONSECA, V. O.; CRUDELI, G. A.; COSTA E SILVA, E. V.; HERMANNY, A. Aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore: efeito de diferentes estações do ano sobre as características seminais, circunferência escrotal e fertilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 7-15, 1992.

FONSECA, V. O. Avaliação reprodutiva de touros para monta a campo: análise crítica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 36-41, 2009.

FOOTE, R. H.; SEIDEL, G. E.; HAHN, J.; BERNDTSON, W. E.; COULTER, G. H. Seminal quality, spermatozoal outpost, and testicular changes in growing Holstein bull. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 1, p. 85-88, 1977.

FRANCO, C. S.; FONSECA, V. O.; GASTE, L. Potencial reprodutivo de touros Nelore acasalados coletivamente na proporção de um touro para cada 100 vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 6, p. 1156-1161, 2006.

GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore submetido à insulação escrotal**. 199, 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

GÁBOR, G.; SASSER, R. G.; KASTELIC, J. P.; MÉZES, M.; FALKAY, G.; BOZÓ, S.; CSÍK, J. V.; BÁRÁNY, I.; HIDAS, A.; JR SZÁSZ, F.; BOROS, G. Computer Analysis of vídeo and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, v. 50, p. 223-228, 1998.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touro Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 258f. Tese (Doutorado em Medicina

Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2004.

GARCIA, A. R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 33-39, 2017.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 2, p. 247-254, 1989.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction**. Book 3. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1998.

GINTHER, O. J., UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**. Book 4. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 2007.

GOFF, J. P. Vitaminas. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 520.

GOYER, R. A.; LIU, J.; WAALKES, M. P. Cadmium and cancer of prostate and testis. **Biometals**, v. 17, p. 555–558, 2004.

GRIFFITHS, K. A.; LY, L. P.; JIN, B.; CHAN, L.; HANDELSMAN, D. J. Transperineal ultrasound for measurement of prostate volume: validation against transrectal ultrasound. **The Journal of Urology**, v. 178, n. 4, p. 1375-1380, 2007.

GUMBSCH, P.; GABLER, C.; HOLZMANN, A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. **The Veterinary Record**, v. 151, n. 5, p. 140-144, 2002.

GUNN, R. M. C.; SANDERS, R. N.; GRANGER, W. Studies in Fertility in Sheep. 2. Seminal changes affecting fertility in rams. **Council for Scientific and Industrial Research**. Boletim 148, Melbourne, p. 15-16, 1942.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução masculina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri/SP: Manole, 2004. p. 3-7.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.

HASSAN, M.; SATTAR, A.; BILAL, M.; AVAIS, M.; AHMAD, N. Evaluation of changes in blood flow of the uterine artery by Doppler ultrasonography during the estrous cycle in lactating *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.07.001. Epub 2017 Jul 9.

HEATH, A. M.; PUGH, D. G.; SARTIN, E. A.; NAVARRE, B.; PUROHIT, R. C. Evaluation of the safety and efficacy of testicular biopsies in llamas. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1125-1130, 2002.

HERTZ, R. H.; TIMOR-TRITSCH, I.; DIERKER JR, L. J.; CHIK, L.; ROSEN, M. G. Continuous ultrasound and fetal movement. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 135, p. 152-154, 1979.

HEW, K. W.; ERICSON, W. A.; WELSH, M. J. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 121, n. 1, p. 15-21, 1993.

HITSCHOLD, T.; MÜNTEFERING, H. Single umbilical artery. Effect on fetal growth and Doppler flow velocity wave form. **Ultraschall in der Medizin**, v. 22, n. 1, p. 17-22, 2001.

HOLM, M.; LENZ, S.; DE MEYTS, E. R.; SKAKKEBAEK, N. E. Microcalcifications and carcinoma in situ of the testis. **British Journal of Urology International**, v. 87, n. 2, p. 144-149, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015. **Efetivos do rebanho, por tipo de rebanho**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#notas-tabela> >. Acesso em: 14 mar. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2015. **Análise das Anomalias das temperaturas no Ano de 2015**. Disponível em: < http://www.inmet.gov.br/portal/notas_tecnicas/2015/nota_tecnica_temperaturas_2015.pdf >. Acesso em 19 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2016. **Panorama Geral das Condições Meteorológicas e Principais Eventos Extremos Significativos Ocorridos no Brasil em 2016**. Disponível em: < http://www.inmet.gov.br/portal/notas_tecnicas/Panorama-Geral-2016-Brasil.pdf >. Acesso em 19 jun. 2017.

KADZERE, C. T.; MURPHY, M. R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59-91, 2002.

KÄHN, W.; FRAUNHOLZ, J.; KASPAR, B.; PYCZAK, T. Sonographic diagnosis of early pregnancy in horses, cattle, sheep, goats, swine, dogs and cats. Standard values and limitations. **Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 103, n. 6, p. 206-211, 1990.

KANATSU-SHINOHARA, M.; TOYOKUNI, S.; MORIMOTO, T.; MATSUI, S.; HONJO, T.; SHINOARA, T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1801-1807, 2003.

KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.; COOK, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 44, n. 1, p. 147-152, 1995.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-261, 1996.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; WALLINS, G. L.; ENTZ, T. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 153-159, 1996.

KASTELIC, J. P. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 271-182, 1997.

KASTELIC, J. P.; BRITO, L. F. C.; Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 3, p. 45-51, 2012.

KHERADMAND, A.; ALIREZAEI, M.; DEZFOULIAN, O. Biochemical and histopathological evaluations of ghrelin effects following cadmium toxicity in the rat testis. **Andrologia**, v. 47, p. 634-643, 2015.

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T.; PERRI, S. H.; VICENTE, W. R. The effect of season on sêmen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 4, p. 587-592, 2009.

KRISHNA, U.; BHALERAO, S. Placental insufficiency and fetal growth restriction. **Journal of Obstetrics & Gynecology of India**, v. 61, n. 5, p. 505-511, 2011.

KUKKONEN, T. M.; BINIK, Y. M.; AMSEL, R.; CARRIER, S. Thermography as a physiological measure of sexual arousal in both men and women. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 4, n. 1, p. 93-105, 2007.

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **The Veterinary Record**, v. 108, n. 1, p. 13-15, 1981.

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. 2011, p. 1-7, doi: 10.4061/2011/638602, 2011.

LEMES, K. M.; SILVA, L. A.; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; PUGLIESI, G.; CARVALHO, H. F.; AFFONSO, F. J.; SILVA, D. F.; LEITE, T. G.; ARRUDA, R. P. Follicular dynamics, ovarian vascularity and luteal development in mares with early or late postpartum ovulation. **Theriogenology**, v. 96, p. 23-30, 2017.

LINDAHL, I. L. Pregnancy diagnosis in dairy goats using ultrasonic Doppler Instruments. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 4, p. 529-530, 1969.

LUNSTRA, D. D.; COULTER, G. H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 767-774, 1997.

MARTELLO, L. S.; LUZ E SILVA, S.; COSTA GOMES, R.; DA SILVA CORTE, R. R.; LEME, P. R. Infrared thermography as a tool to evaluate body surface temperature and its relationship with feed efficiency in *Bos indicus* cattle in tropical conditions. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 1, p. 173-181, 2016.

MARTINO, P. M.; GALOSI, A. B.; BITELLI, M.; CONSONNI, P.; FIORINI, F.; GRANATA, A.; GUNELLI, R.; LINGUORI, G.; PALAZZO, S.; PAVAN, N.; SCATTONI, V.; VIRGILI, G. Practical recommendations for performing ultrasound scanning in the urological and andrological fields. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, v. 86, p. 56-78, 2014.

MARTINS, P. C.; GALDEANO, J. V. B.; LEÃO, K. M.; MESQUITA, A. A.; SILVA, F. R.; SILVA, M. A. P. Efeito da temperatura ambiente sobre a viabilidade do sêmen de varrões. **Pubvet**, v. 5, n. 20, ed. 167, art. 1127, 2011.

MATTOON, J. S.; NYLAND, T. G. Próstata e Testículos. In: MATTOON, J. S.; NYLAND, T. G. **Ultra-som diagnóstico em pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 255.

MENEGASSI, S. R.; BARCELLOS, J. O.; DIAS, E. A.; KOETZ, C. JR.; PEREIRA, G. R.; PERIPOLLI, V.; MACMANUS, C.; CANOZZI, M. E.; LOPES, F. G. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 3, p. 357-64, 2014.

MEYERHOEFFER, D. C.; WETTEMANN, R. P.; COLEMAN, S. W.; WELLS, M. E. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 352-357, 1985.

MITTAL, P. K.; LITTLE, B.; HARRI, P. A.; MILLER, F. H.; ALEXANDER, L. F.; KALB, B.; CAMACHO, J. C.; MASTER, V.; HARTMAN, M.; MORENO, C. C. Role of imaging in the evaluation of male infertility. **Radiographics**, v. 37, n. 3, p. 837-854, 2017.

MONTEIRO, M. F.; FILHO, D. C. S. Exercício físico e o controle da pressão arterial. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 6, p. 513-516, 2004.

MOULE, G. R.; WAITES, G.M. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temprature of the scrotum. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 5, p. 433-446, jun. 1963.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

MUCCIOLO, R. G.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 155-177, 1974.

MÜLLER, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BRADEN, S.; EDQVIST, L. E. Testicular ultrastructure of Zebu bulls in Costa Rica. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v. 39, n. 5, p. 382-391, 1992.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003. p. 96-100.

NETO, C. R.; RODELLO, L.; BICUDO, S. D. Termografia escrotal em ovinos pré-púberes submetidos a estresse térmico. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p.1017-1019, 2011.

NETTO, J. N. R.; LEMOS, G. C.; BARBOSA, E. M. The value of thermography and of the Doppler ultrasound in varicocele diagnosis. **International Journal of Fertility**, v. 29, n. 3, p. 176-179, 1984.

NIKKHAH, A.; PLAIZIER, J. C.; EINARSON, M. S.; BERRY, R. J.; SCOTT, S. L.; KENNEDY, A. D. Short communication: infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2749-2753, 2005.

NRC, National Research Council. Nutrient requirements of beef cattle, 8. ed. Washington DC: National Academic of Science. p. 494, 2016.

OLDEREID, N. B. THOMASSEN, Y. ATTRAMADAL, A.; OLAISEN, B.; PURVIS, K. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 421–425, 1993.

PAIVA, F. S. **Aspectos socioeconômicos e produtivos da atividade leiteira no estado do Acre**. 2015. 46f. Dissertação (Mestrado Profissional em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2015.

PALMER, C. W. Management and Breeding Soundness of Mature Bulls. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 479-495, 2016.

PALTIEL, H. J.; RUPICH, R. C.; BABCOCK, D. S. Maturational changes in arterial impedance of the normal testis in boys: Doppler sonographic study. **American Journal of Roentgenology**, v. 163, n. 5, p. 1189-1193. 1994.

PARKINSON, T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: correlation with environmental temperature. **The Veterinary Record**, v. 120, n. 20, p. 479-482, 1987.

PARRISH, J. J.; WILLENBURG, K. L.; GIBBS, K. M.; YAGODA, K. B.; KRAUTKRAMER, M. M.; LOETHER, T. M.; MELO, F. C. S. A. Scrotal insulation and

sperm production in the boar. **Molecular Reproduction and Development**, doi: 10.1002/mrd.22841. [Epub ahead of print], 2017.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 913-919, 2009.

PECHMAN, R. D.; EILTS, B. E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**, v. 27, n. 2, p. 431-441, 1987.

PEZZINI, T. G.; SARTORI, R.; SILVA, T. A. S. N.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 863-868, 2006.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, v. 23, n. 5, p. 795-806, 1985.

PINGGERA, G. M.; MITTERBERGER, M.; BARTSCH, G.; STRASSER, H.; GRADL, J.; AIGNER, F.; PALLWEIN, L.; FRAUSCHER, F. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. **British Journal of Urology International**, v. 101, n. 6, p. 722-726, 2008.

POZOR, M. A.; MCDONNELL, S. M. Doppler ultrasound measures of testicular blood flow in stallions. **Theriogenology**, v. 58, p. 437-440, 2002.

POZOR, M. A.; MCDONNELL, S. M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 799-810, 2004.

POZOR, M. A. Evaluation of testicular vasculature in stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 271-277, 2007.

POZOR, M.; MORRISSEY, H.; ALBANESE, V.; KHOUZAM, N.; DERIBERPREY, A.; MACPHERSON, M. L.; KELLEMAN, A. A. Relationship between echotextural and histomorphometric characteristics of stallion testes. **Theriogenology**, v. 99, p. 134-145, 2017.

PUROHIT, R. C.; HUDSON, R. S.; RIDDELL, M. G.; CARSON, R. L.; WOLFE, D. F.; WALKER, D. F. Thermography of the bovine scrotum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 11, p. 2388-2392, 1985.

PUTLEY, E.H. History of infrared detection – The first detectors of thermal radiation. **Infrared Physics**, v.22, p. 125-131, 1982.(a)

PUTLEY, E.H. History of infrared detection – The first thermographs. **Infrared Physics**, v.22, p. 189-191, 1982.(b)

PUTLEY, E.H. In.: RING, E.F.J.; PHILLIPS, B. Recent advances in medical thermology. New York: Plenum Press, 1984. p. 151-166.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELARE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246-1257, 2011.

RANDALL, D. J.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal** – mecanismos e adaptações. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008. p. 649-650.

RAO, A. R. Experimental testicular degeneration in a bull. **The Indian Veterinary Journal**, v. 44, n. 12, p. 1022-1024, 1967.

RAO, K.V.; SASTRY, G.J.; KOTAYYA, K. A note on morphological abnormalities of spermatozoa of Murrah buffalo bulls. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 43, p. 342-343, 1973.

REED, K. L.; CHAFFIN, D. G.; ANDERSON, C. F. Umbilical venous doppler velocity pulsations and inferior vena cava pressure elevations in fetal lambs. **Obstetrics & Gynecology**, v. 87, n. 4, p. 617-620, 1996.

REEVES, J. J.; RANTANEN, N. W.; HAUSER, M. Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 485-494, 1984.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREIDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 58-68.

RIBADU, A. Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: A review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, n. 1, p. 13–28, 1999.

RICCA, R. Infrared history and applications. **Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine**. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, 2013. p. 3-4.

ROSILES, V. A.; GALINA, C. S.; MAQUIVAR, M.; MOLINA, R.; ESTRADA, S. Ultrasonographic screening of embryo development in cattle (*Bos indicus*) between days 20 and 40 of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 31-37, 2005.

RUEDIGER, F. R.; CHACUR, M. G. M.; ALVES, F. C. P. E.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Digital infrared thermography of scrotum, semen quality, serum testosterone levels in Nelore bulls (*Bos Taurus indicus*) and their correlation with climatic factors. **Ciências Agrárias**, v. 37, n.1, p. 221-231, 2016.

SANTOLAYA, J.; KAHN, D.; NOBLES, G.; RAMAKRISHNAN, V.; WARSOFF, S. L. Ultrasonographic growth and Doppler hemodynamic evaluation of fetuses of obese women. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 39, n. 6, p. 690-694, 1994.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2.ed. USA: Current Conceptions, 2003, 373p.

SEOANE, M. P. R.; GARCIA, D. A. A.; FROES, T. R. A história da ultrassonografia veterinária em pequenos animais. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 54-61, 2011.

SETCHELL, B. P. The Parkes lecture: heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SHORE, M. D.; BRETZLAFF, K. N.; THOMPSON, J. A.; MAGEE, D. D. Outcome of scrotal hydrocele in 26 bulls. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 207, n. 6, p. 757-760, 1995.

SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. p. 21-22, 119-120.

SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; CORDEIRO, C. M. T.; FREITAS, A. R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SILVA, L. A. Ultrassonografia Doppler na reprodução equina: presente e futuro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, São Paulo, v. 29, p. 66-77, 2010.

SILVA, L. D. M.; BARBOSA, C. C.; PEREIRA, B. S. O uso da ultrassonografia Doppler na reprodução de cadelas e gatas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 198-201, 2011.

SNOEK, R.; ALBERS, M.; MULDER, E. J. H.; LICHTENBELT, K. D.; DE VRIES, L. S.; NIKKELS, P. G. J.; CUPPEN, I.; PISTORIUS, L. R.; MANTEM, G. T. R. DE HEUS, R. Accuracy of diagnosis and counseling of fetal brain anomalies prior to 24 weeks of gestational age. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, p. 1-7, 2017.

SOUZA, L. W. O. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF1 no plasma seminal de touros (Bos taurus taurus) submetidos à degeneração testicular**. 2004. 183f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2004.

STEWART, M.; STAFFORD, K. J.; DOWLING, S. K.; SCHAEFER, A. L.; WEBSTER, J. R. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 4-5, p. 789-797, 2008.

STRÖMBERG, B. Thermography in veterinary horse. **Bibliotheca Radiologica**, n. 6, p. 231-236, 1975.

SUESS, G.; RAIIO, L.; KUHN, A.; DI NARO, E.; SURBEK, D. Arterial-adaptive dilation and Doppler velocimetry in normal fetuses with a single umbilical artery. **Ultraschall in der Medizin**, v. 30, n. 5, p. 485-489, 2009.

TARANTINO, S. Infrared thermography in equine and cattle. **Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine**. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, 2013. p. 99-100.

THOMÉ, H. E.; SANTIS, G. W.; MOURA, V. M. B. D.; AMORIM, R. L.; BANDARRA, E. P. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida da região de São João da Boa Vista, SP. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 745-755, out./dez. 2007.

TITTO, E. A. L.; VELOSO, L.; ZANETTI, M. A.; CRESTA, A.; TOLEDO, L. R. A.; MARTINS, J. H. Teste de tolerância ao calor em novilhos Nelore e Marchigiana. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 5, n. 1, p. 67-70, 1998.

TITTO, C. G. **Comportamento de touros da raça Simental à pasto com recurso de sombra e tolerância ao calor**. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2006.

TOMLINSON, M.; JENNINGS, A.; MACRAE, A.; TRUYERS, I. 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.

TORP-PEDERSEN, S. T.; TERSLEV, L. Settings and artefacts relevant in colour/power Doppler ultrasound in rheumatology. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 2, p. 143-149, 2008. Disponível em: < <http://ard.bmj.com/content/67/2/143> >. Acesso em 20 ago. 2017.

TRUDINGER, B. J.; GILES, W. B.; COOK, C. M.; BOMBARDIERI, J.; COLLINS, L. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: clinical significance. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 92, n. 1, p. 23-30, 1985.

TRUM, J. W.; GUBLER, F. M.; LAAN, R.; VAN DER VEEN, F. The value of palpation, varicoscreen contact thermography and colour Doppler ultrasound in the diagnosis of varicocele. **Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1232-1235, 1996.

VAN CAMP, S. D. Common causes of infertility in the bull. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 203-231, 1997.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; TAYLOR, T. S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 493-509, 2000.

VINTZILEOS, A. M.; CAMPBELL, W. A.; NOCHIMSON, D. Relation between fetal heart rate accelerations, fetal movements, and fetal breathing movements. **American Journal of Perinatology**, v. 3, n. 1, p. 38-40, 1986.

VIU, M. A. O.; MAGNABOSCO, C. U.; FERRAZ, H. T.; GAMBARINI, M. L.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; LOPES, D. T.; VIU, A. M. F. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. **Archives of Veterinary Science, Curitiba**, v. 11, n. 3, p.53-57, 2006.

VOGLER, C. J.; BAME, J. H.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1207-1219, 1993.

VON BUBNOFF, N.; DUYSER, J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 107, n. 7, p. 114-121, 2010.

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

WEIDNER, W. Use of transrectal ultrasonography of the prostate gland and seminal vesicles in andrology - 3 years experience. **Acta Europaea Fertilitatis**, v. 16, n. 2, p. 117-123, 1985.

WIEBE, J. P.; KOWALIK, A.; GALLARDI, R. L.; EGELER, O.; CLUBB, B. H. Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 625-635, 2000.

YIN, Y.; HAWKINS, K. L.; DEWOLF, W. C.; MORGENTALER, A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 159-165, 1997.

ZELLI, R.; TROISI, A.; ELAD NGONPUT, A.; CAR DINALI, L.; POLISCA, A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 632-637, 2013.

ZERVOS, I. A.; TSANTARLIOTOU, M. P.; VATZIAS, G.; GOULAS, P.; KOKOLIS, N. A.; TAITZOGLU, I. A. Effects of dietary vitamin A intake on acrosin- and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, n. 6, p. 707-715, jul. 2005.

ZOHNI, K.; ZHANG, X.; TAN, S. L.; CHAN, P.; NAGANO, M. C.; The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. **Human Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 44-53, 2012.

APÊNDICE A

Tabela 29 – Temperaturas ambientais máxima e mínima (°C) e Umidade relativa do ar máxima e mínima (%) aferidas no curral de manejo localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA/FMVZ), Campus de Pirassununga, no período pré-insulação (S-2 e S-1), no D0 e pós-insulação (S+1 a S+4)

	Temp. Amb. (°C)		U.R. (%)	
SEMANAS	Mín.	Máx.	U.R. Min.	U.R. Máx.
S-2	20,50	32,80	37,40	85,60
S-1	16,70	30,00	28,40	76,50
D0	18,70	25,60	59,10	100,00
S+1	20,80	34,40	34,50	74,70
S+2	22,60	36,80	31,70	95,60
S+3	21,30	31,40	57,30	96,70
S+4	16,30	31,50	39,00	74,90