



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

LÍLIAN KÁTIA XIMENES SILVA

**Qualidade seminal de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e sua relação com
fatores ambientais e nutricionais**

Belém
2016

LÍLIAN KÁTIA XIMENES SILVA

Qualidade seminal de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e sua relação com fatores ambientais e nutricionais

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia

Coorientador: Prof. Dr. José de Brito Lourenço Júnior

**Belém
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da UFPA

Silva, Lílian Kátia Ximenes, 1981-

Qualidade seminal de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e sua relação com fatores ambientais e nutricionais / Lílian Kátia Ximenes Silva. - 2016.

Orientador: Alexandre Rossetto Garcia; Coorientador: José de Brito Lourenço Júnior.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Campus de Castanhal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2016.

1. Búfalo -- Reprodução. 2. Búfalo -- Nutrição. 3. Semên. 4. Regulação da Temperatura Corporal. I. Título.

CDD 22. ed. 636.293

LÍLIAN KÁTIA XIMENES SILVA

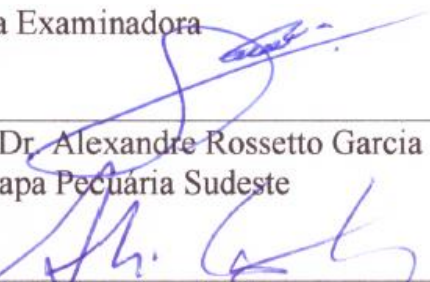
Qualidade seminal de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e sua relação com fatores ambientais e nutricionais

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

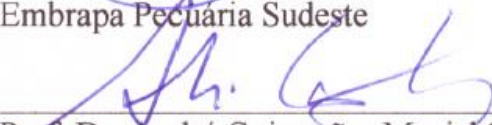
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém-PA: 17/06/2016

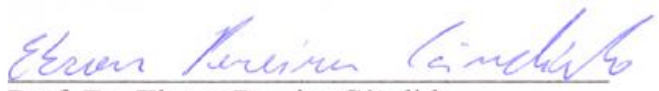
Banca Examinadora



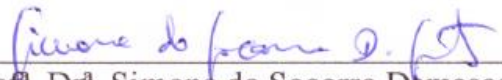
Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia
Embrapa Pecuária Sudeste



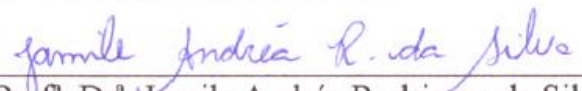
Prof. Dr. André Guimarães Maciel Silva
Universidade Federal do Pará



Prof. Dr. Ebson Pereira Cândido
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr^a. Simone do Socorro Damasceno Santos
Universidade Federal do Pará



Prof^a. Dr^a. Jamile Andréa Rodrigues da Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia

A **Deus**, pelo seu amor incondicional com o qual me atrai diariamente! Por ser tudo pra mim! A Ele seja sempre toda glória e honra.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A meus pais, **Edmilson e Lisânias Ximenes**, por seus ensinamentos e valores transmitidos, os quais me encorajam a permanecer sempre firme! Vocês são a expressão de um amor incondicional, que sempre me acolhe e deseja o meu bem. Amarei vocês eternamente.

Ao meu amado e incomparável irmão, **Cláudio Ximenes**, pelas sempre constantes manifestações de amor! Tê-lo sempre ao meu lado tranquiliza meu viver! Amo você.

A minha cunhada, **Francy Cruz Ximenes**, pelos gostosos momentos de descontrações, conversas e risadas. Amo você.

Ao meu amor e companheiro, **Lung Silva**, sou realizada por tê-lo ao meu lado! Obrigada por compartilharmos e desfrutarmos a vida juntos, tornando-a mais leve e harmônica. Amo você.

Ao meu presente do céu, **Lívia Ximenes Silva**, você é a manifestação da bondade de Deus na minha vida! Com você os meus dias são infinitamente mais doces e felizes.

Ao querido tio **Luís e família**, por estarem tão próximo a mim, mesmo com vários quilômetros nos separando. Obrigado pelas constantes orações e expressões de amor.

Ao professor, orientador e amigo **Alexandre Rossetto Garcia**, por ser uma pessoa extremamente coerente e correta, que me transmitiu valores e conceitos que levarei por toda a vida! Saiba que lhe admiro muito! Obrigada por tudo!

Aos professores e grandes amigos **Aluizio Otavio Almeida da Silva e José Silva de Sousa**, pelos inesquecíveis momentos vividos, pelos conselhos e por sempre me acolherem e me ajudarem em momentos bons e ruins! Vocês fazem parte da minha vida! Obrigada por tudo!

À professora e companheira de pós-graduação **Adriana Reis**, pelo apoio e colaboração à realização de parte deste trabalho, sua presença foi de fundamental importância.

Ao professor **José de Brito Lourenço Júnior**, pela presença marcante durante a realização deste trabalho, obrigada por sempre está disposto em ajudar.

À querida professora **Lucieta Guerreiro Martorano**, pelo auxílio constante, não medindo esforços para a realização deste trabalho.

Ao professor **Moyses Miranda**, pelo apoio na realização de parte deste trabalho, obrigada por sempre amenizar as dificuldades encontradas e me fazer acreditar que sempre daria certo.

Ao professor **André Guimarães Maciel Silva**, pelo apoio recebido durante a realização de deste trabalho.

Ao **Alysson Sousa**, por sua marcante presença, de longe ou de perto, pelos livros cedidos e tantas palavras de incentivo direcionadas a mim.

Ao professor **Cristian Faturi**, pelo auxílio com as análises estatísticas e pela enorme paciência com minhas dúvidas.

Ao colega de pós-graduação **Daniel Barros**, pelos bons momentos de trabalho conjunto.

À colega de pós-graduação **Messy Hannear de Andrade Pantoja**, pelo imenso apoio nas análises das imagens termográficas.

A colega de pós-graduação **Alessandra Ximenes**, pelo apoio recebido durante a realização de parte deste trabalho.

Ao colega **Eziquiel de Moraes**, pela constante disposição em ajudar.

A todos os funcionários da Cebran: **Sr. Miller, Badu, Bicudo, Jane, Lucilene, Marilena, Helbilena e Raquel**, por tornarem o experimento e a minha vida mais leve.

À **Cebran-UFPA**, representada pelos professores **Aluizio Otavio Almeida da Silva** e **José Silva de Sousa**, pelo inesgotável apoio recebido para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Reprodução Animal e Fecundação *in Vitro* (UFPA), representado pelo professor **Otávio Mítio Ohashi**, pela apoio recebido para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural (LBE - UFPA), representado pelo professor **Chubert Bernardo Castro de Sena**, aos seus funcionários e estagiários, pelo imenso apoio recebido na realização da citometria de fluxo.

Ao Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LAPAC - UFPA) e ao Laboratório de Catálise e Oleoquímica (LCO - UFPA), representados pelo professor **Geraldo Narciso**, e aos seus estagiários **Érica Mares, Fernando Souza** e **Lorena da Silva**, pelo grande e constante apoio na realização de avaliações lipídicas e cromatografia gasosa.

Ao Laboratório de Análises e Desenvolvimento do Espaço Construído (LADEC - UFPA), representado pelo professor **Irving Montanar Franco**, pelo imenso e incansável apoio na realização das termografias infravermelhas.

À Agropecuária Santa Rita, na pessoa do Sr. **William Sousa**, pelo apoio ao ceder animais para a realização deste trabalho.

À **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, unidades da Amazônia Oriental e da Pecuária Sudeste**, pela colaboração ao ceder animais para a realização deste trabalho e pelo apoio financeiro (Projetos PECUS-01100600107 e BIOTEC-01130600105).

À **Universidade Federal do Pará** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** pela concessão de bolsa de estudos.

Aos professores membros da banca, **Simone do Socorro Damasceno Santos, Jamile Andréa Rodrigues da Silva** e **Ebson Pereira Cândido**, pelas valiosas sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A **todos** que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

*“Que darei eu ao Senhor, por todos os
benefícios que me tem feito?” Salmo 116:12*

RESUMO

Objetivou-se avaliar a relação existente entre a qualidade seminal de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e fatores ambientais e nutricionais. Foram utilizados onze (11) touros bubalinos Murrah, em dois ensaios experimentais, realizados em região de clima tropical úmido. O primeiro ensaio foi dividido em três períodos (mais chuvoso, de transição e menos chuvoso) e compreendeu a avaliação mensal da frequência respiratória (mov/min), frequência cardíaca (bat/min), temperatura retal (°C), temperatura de globo ocular (TGO; °C) e temperaturas de superfície escrotal (°C) por termografia de infravermelho, nos turnos da manhã e da tarde. Foram realizadas colheitas e avaliação seminal quinzenais, além do cálculo do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e do Índice de Conforto de Benezra (ICB). Os touros bubalinos apresentaram termogramas normais, não sendo constatadas alterações na termorregulação testículo-escrotal e na qualidade seminal. As temperaturas de globo ocular, da cauda do epidídimo e testicular mínima avaliadas por termografia se mostraram úteis na avaliação da potencial fertilidade de touros bubalinos. No segundo ensaio os animais foram distribuídos em três grupos experimentais (CONT - Grupo Controle; CPO - Óleo de Palma Bruto; RRP - Resíduo do Refino de Palma), sendo avaliado o efeito da suplementação lipídica na qualidade do sêmen. A cada 15 dias, foram realizadas colheitas e criopreservação de sêmen. O sêmen *in natura* foi avaliado quanto a motilidade espermática progressiva (%), vigor (1 a 5), viabilidade (VIAB, %), defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e defeitos totais (%). O sêmen criopreservado foi adicionalmente avaliado quanto à integridade de membrana plasmática e de acrossoma, bem como seu potencial mitocondrial. Além, da análise do perfil lipídico do plasma seminal e membrana plasmática espermática *in natura*. Os coprodutos agroindustriais, óleo de palma bruto e resíduo do refino de palma podem ser utilizados na alimentação de touros bubalinos em centrais de inseminação artificial, causando efeitos positivos na qualidade do sêmen criopreservado.

Palavras-chave: Búfalos domésticos; conforto térmico; termorregulação; sêmen; nutrição de ruminantes, ácidos graxos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the relationship between semen quality of buffaloes bulls (*Bubalus bubalis*) and environmental factors and nutritional. Eleven (11) were used Murrah buffaloes bulls, two experimental tests performed in humid tropical climate region. The first test was divided into three periods (rainiest, transition and less rainy) and understood the monthly evaluation of respiratory rate (mov/min), heart rate (beats/min), rectal temperature ($^{\circ}$ C), eye globe temperature (TGO; $^{\circ}$ C) and scrotal surface temperature ($^{\circ}$ C) for infrared thermography, the shifts in the morning and afternoon. Collected and fortnightly seminal evaluation were carried out, in addition to the calculation of the temperature and humidity index (THI) and Comfort Benezra Index (ICB). The buffaloes bulls presented normal thermograms, and no changes were observed in testicular-scrotal thermoregulation and semen quality. The eye globe temperature, the epididymal tail and minimal testicular measured by thermography been useful in the evaluation of potential fertility of buffaloes bulls. In the second test the animals were distributed into three experimental groups (CONT - Control Group; CPO - Crude Palm Oil; PPR - Palm Refining Residue), and evaluated the effect of lipid supplementation on semen quality. Every 15 days collections were carried and cryopreservation of semen. The semen *in natura* was evaluated for spermatic progressive motility (%), vigor (1-5), viability (VIAB, %), major defects (%), minor defects (%) and total defects (%). The cryopreserved semen was further evaluated for the integrity of the plasma membrane and acrosome and their mitochondrial potential. In addition, analysis of the lipid profile of seminal plasma and sperm plasma membrane *in natura*. The agroindustrial co-products, crude palm oil and palm refining residue can be used in feeding central buffaloes bulls in artificial insemination, causing positive effects on quality of cryopreserved semen.

Keywords: Water buffaloes; Thermal comfort; Thermoregulation; Semen; Nutrition of ruminants; Fatty acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 2

Figura 1	Imagem termográfica ilustrativa do escroto de touro bubalino em conforto térmico; notar o padrão decrescente de temperatura desde a região do cone vascular à cauda do epidídimo, em três bandas horizontais distintas (a). Gráfico das médias de temperaturas de superfície observadas nas diferentes regiões do escroto de touros bubalinos com termograma normal (b).....	47
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1	Médias mensais dos valores registrados em estação meteorológica automática durante o período experimental, Castanhal, Pará, Brasil.....	48
Tabela 2	Média±desvio padrão dos índices de conforto térmico nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical.....	49
Tabela 3	Média±desvio padrão das variáveis fisiológicas nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical.....	50
Tabela 4	Média±desvio padrão das temperaturas de superfície escrotal aferidas por termografia de infravermelho nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima.....	51
Tabela 5	Média±desvio padrão dos gradientes de temperaturas de superfície escrotal nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical.....	52
Tabela 6	Média±desvio padrão das variáveis seminais nos diferentes períodos de touros búfalos criados em clima tropical	

.....	54
Tabela 7	Correlação linear entre temperaturas de superfície escrotal e índices de conforto térmico, variáveis fisiológicas e seminais de touros búfalos criados em clima tropical..... 58

ARTIGO 3

Tabela 1	Composição percentual das dietas experimentais (% da Matéria Seca) oferecidas aos diferentes grupos experimentais..... 81
Tabela 2	Composição química dos concentrados fornecidos aos diferentes grupo..... 82
Tabela 3	Composição (%) de ácidos graxos dos coprodutos utilizados no experimento..... 85
Tabela 4	Média±desvio padrão do sêmen <i>in natura</i> e criopreservado de touros bubalinos nos diferentes grupos..... 86
Tabela 5	Média±desvio padrão do sêmen criopreservado de touros bubalinos submetido a avaliação através de sondas nos diferentes grupos..... 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Bat/min** - batimentos cardíacos por minutos
- CBRA** - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- CONC** - concentração espermática
- DMA** - defeitos espermáticos maiores
- DME** - defeitos espermáticos menores
- DT** - defeitos espermáticos totais
- FC** - frequência cardíaca
- FR** - frequência respiratória
- GTEST** - gradiente de temperatura testicular
- GTRCE** - gradiente de temperatura retal-cauda do epidídimo
- GTREMed** - gradiente de temperatura retal-escrotal
- GTRFE** - gradiente de temperatura retal-funículo espermático
- GTRPD** - gradiente de temperatura retal-polo dorsal dos testículos
- GTRPV** - gradiente de temperatura retal-polo ventral dos testículos
- ICB** - Índice de Conforto de Benezra
- IMP** - integridade de membrana plasmática
- ITU** - Índice de Temperatura e Umidade
- mL** - mililitro, unidade de volume
- Mov/min** - movimentos respiratórios por minuto
- MP** - motilidade espermática progressiva
- °C** - grau Celsius, unidade de temperatura
- P** - símbolo estatístico que denota grau de significância entre as variáveis estudadas
- PUFAS** - ácidos graxos poli-insaturados
- sptz/mL** - espermatozoides por mililitro, unidade de concentração espermática
- TCE** - temperatura da cauda do epidídimo
- TEMax** - temperatura escrotal máxima
- TEMed** - temperatura escrotal média
- TEMin** - temperatura escrotal mínima
- TFE** - temperatura de funículo espermático
- TGO** - temperatura de globo ocular

TPTD - temperatura polo testicular dorsal

TPTV - temperatura polo testicular ventral

TR - temperatura retal

TS - temperatura da superfície

TSE - temperaturas de superfície escrotal

VOL - volume espermático

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm - símbolo utilizado entre as unidades estatísticas de média e desvio padrão

\leq - símbolo matemático que indica valores iguais ou inferiores

\geq - símbolo matemático que indica valores iguais ou superiores

% - porcentagem, unidade de razão na base 100

10^9 - bilhões

x - vezes

$^{\circ}$ - grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 ARTIGO 1 - EFEITO DO MANEJO AMBIENTAL E NUTRICIONAL NA PRODUTIVIDADE DE TOUROS BUBALINOS (<i>BUBALUS BUBALIS</i>) NA AMAZÔNIA.....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
4. ARTIGO 2 - PADRÕES DE TEMPERATURA DE SUPERFÍCIE ESCROTAL, TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR E QUALIDADE SEMINAL DE TOUROS BÚFALOS CRIADOS EM CLIMA TROPICAL.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
5. ARTIGO 3 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA NA QUALIDADE SEMINAL DE TOUROS BUBALINOS (<i>BUBALUS BUBALIS</i>).....	68
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	69
INTRODUÇÃO.....	69
MATERIAL E MÉTODOS	71
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	83
6 CONCLUSÃO GERAL.....	89

1 INTRODUÇÃO

O interesse na criação de búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) tem aumentado nos últimos anos em todo o mundo. Um dos motivos é o fato desses animais serem considerados rústicos e com aptidão para produção de leite e carne, além de seu uso em tração (Barile, 2005; da Luz et al. 2013). No Brasil, os búfalos foram introduzidos no final do século XIX, na Ilha de Marajó, Estado do Pará, estando atualmente disseminado em todo o país (Amorim Junior et al., 2002). O rebanho bubalino brasileiro é o maior das Américas (Damasceno et al., 2010), sendo da ordem de 1.319.478 milhões de cabeças. A maior concentração desse plantel está na Região Norte, onde são criados 66,1% do efetivo, mais especificamente nos Estados do Pará e Amapá (IBGE, 2014).

Tanto no Brasil como em outras partes do mundo, grande contingente do rebanho bubalino é criado em áreas intertropicais, caracterizadas por elevadas temperaturas e umidade relativa do ar durante a maior parte do ano. Apesar dos búfalos serem adaptáveis, a exposição prolongada a essas variáveis pode afetar seus mecanismos termoregulatórios, submetendo-os a estresse térmico (Marai e Haeeb, 2010a; Garcia, 2013; Silva et al., 2015).

O estresse térmico pode provocar alterações na ingestão de alimentos, na sua digestão, bem como na taxa metabólica dos animais, prejudicando seu desempenho produtivo e reprodutivo (Starling et al., 2005; Garcia, 2006; Marai et al., 2007; Nóbrega et al., 2011). Nos machos, o estresse pelo calor é responsável pela redução da qualidade e viabilidade seminal. Do mesmo modo, a qualidade seminal de touros bubalinos também pode ser influenciada diretamente pela composição lipídica da dieta, a qual pode intervir na proporção de fosfolipídeos das membranas espermáticas, modificando sua integridade e capacidade fecundante (Nelson e Cox, 2005; Adeel et al., 2009; Hernández, 2010).

Diante desse contexto, existe necessidade e interesse em se investigar os fatores ambientais e nutricionais que influenciam a qualidade seminal de touros bubalinos. Além disso, interessa verificar se estratégias de manejo promovem alterações na qualidade e viabilidade do sêmen *in natura* e criopreservado desses animais. As informações obtidas poderão levar à implantação de medidas de manejo que incrementem os índices produtivos e reprodutivos dos rebanhos bubalinos, principalmente daqueles criados em regiões de clima tropical.

A presente tese foi estruturada em modelo híbrido, aceite pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará. A tese abrange tópicos convencionais (introdução, objetivos e conclusão geral), além de três capítulos em formato de

artigos científicos, apresentados segundo as normas exigidas pelos periódicos selecionados para futura submissão. O primeiro artigo contempla uma revisão de literatura sobre a temática específica da tese, enquanto o segundo e terceiro artigos contêm resultados inéditos de pesquisa científica. Ao final da tese, foram destacados os achados mais relevantes aliados aos futuros desdobramentos desta pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação existente entre fatores ambientais e nutricionais e a qualidade seminal de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*), possibilitando a implantação de estratégias de manejo que visem incrementar os índices produtivos e reprodutivos de touros bubalinos, que podem ser usados tanto em programas de monta natural como em centrais de inseminação artificial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Elaborar revisão de literatura consistente sobre fatores ambientais e nutricionais que interferem na criação de bubalinos, servindo de base para a implantação e/ou a adoção de medidas de manejo que incrementem a produtividade do rebanho bubalino.

b) Avaliar o efeito do período mais chuvoso, de transição e menos chuvoso do ano sobre o conforto térmico de touros bubalinos e suas consequências no padrão de temperaturas da superfície escrotal, na termorregulação testículo-escrotal e na qualidade seminal de bubalinos em clima tropical.

c) Avaliar o efeito da suplementação alimentar com ácidos graxos no perfil lipídico do plasma seminal e na composição lipídica da membrana espermática, e estudar o possível efeito da dieta na qualidade do sêmen *in natura* e criopreservado de touros bubalinos.

3. Artigo 1 - Efeito do manejo ambiental e nutricional na produtividade de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) na Amazônia

*Effects of environmental and nutritional management on productivity of buffaloes bulls (*Bubalus bubalis*) in the Amazon*

Artigo a ser submetido ao Periódico *Semina Ciências Agrárias*

Resumo

Os búfalos domésticos são considerados animais rústicos, mas quando submetidos a condições de manejo adversas podem ter sua produtividade reduzida. A exposição prolongada a elevadas temperaturas e umidade relativa do ar e a intensa radiação solar direta podem ocasionar estresse térmico nestes animais. Além disso, a nutrição, mais especificamente a composição lipídica da dieta, influencia a viabilidade e a qualidade seminal. Por estes motivos, o conhecimento de fatores ambientais e nutricionais que interferem na criação de bubalinos podem servir de base para à implantação e/ou à adoção de medidas de manejo que incrementem seus índices produtivos e reprodutivos, principalmente daqueles animais criados em regiões de clima tropical.

Palavras-chave: Ambiente. Búfalos. Conforto Térmico. Desempenho zootécnico. Nutrição animal. Termorregulação.

Abstract

Water buffaloes are considered rustic animals, but when subjected to adverse management conditions they may present reduced productivity. Prolonged exposure to elevated air temperature, relative humidity and intense direct solar radiation can submit them to heat stress. Furthermore, the nutrition, more particularly the lipid composition of the diet, can lay a important role on sperm viability and seminal quality. Thus, the knowledge about the environmental and nutritional factors that influence the livestock of buffaloes can constitute the basis for implementation and/or adoption of management strategies in order to increase their productive and reproductive indexes, especially when those animals are raised on tropical regions.

Keywords: Environment. Water buffaloes. Thermal comfort. Zootechnic performance. Animal nutrition. Thermoregulation.

Introdução

A maior parte do rebanho bubalino no Brasil é criado em sistema de pastagens nativas ou cultivadas (BERNADES, 2007), localizadas em áreas intertropicais. Estas regiões são caracterizadas por apresentarem altos níveis de radiação solar, elevadas temperaturas e umidade relativa do ar durante grande parte do ano. Apesar dos búfalos serem considerados animais adaptáveis a diversos ambientes (VALE et al., 2008; MARAI e HAEEB, 2010a), a exposição prolongada às condições climáticas tropicais representa um desafio. Em função de peculiaridades fenotípicas, como pele escura e baixa densidade pilosa, os búfalos são mais susceptíveis a absorverem radiação direta, o que pode afetar sua capacidade termorregulatória, os levando à condição de estresse térmico (SILVA et al., 2010b; GARCIA, 2013; SILVA et al., 2015a). Como a termorregulação nos animais homeotérmicos tem componentes que dependem de gasto energético, a necessidade constante de perda de calor por mecanismos ativos, como a ofegação e a sudorese, pode prejudicar o desempenho produtivo e reprodutivo desses animais (GARCIA, 2006; MARAI et al., 2007). Além disso, o estresse pelo calor influencia negativamente a qualidade seminal em touros bubalinos (SANTOS et al. 2014).

Outro fator que interfere diretamente na produtividade animal é a nutrição, exercendo influência na reprodução animal (BARTH et al., 2008). Por este motivo, a suplementação alimentar, principalmente em períodos mais críticos do ano, como os de estiagem, representa uma estratégia interessante para a elevação dos índices reprodutivos de rebanhos bubalinos (GARCIA, 2006; RANJAN et al., 2012). Na tentativa de se elevar a qualidade seminal de bubalinos pelo manejo alimentar, alterações na composição lipídica da dieta têm sido propostas. Sabe-se que a composição lipídica da dieta pode influenciar diretamente a proporção de fosfolípidios das membranas espermáticas, modificando sua integridade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (ADEEL et al., 2009).

Assim, a presente revisão de literatura tem como objetivo apresentar uma síntese de informações científicas sobre manejo do ambiente térmico e manejo alimentar, que podem contribuir para a modificação de práticas produtivas e elevar a eficiência reprodutiva de touros bubalinos criados na Amazônia brasileira.

Estresse Térmico

Os búfalos são animais homeotérmicos e, por isso, são capazes de manter sua temperatura corpórea dentro de uma estreita faixa. Para tal, utilizam alguns artifícios

fisiológicos e comportamentais que auxiliam na sua termorregulação, principalmente quando o animal se encontra fora de sua zona de termoneutralidade. A zona termoneutra é, portanto, a faixa de temperatura ambiente considerada ideal para manutenção da espécie em conforto térmico, situação na qual é mínima a necessidade de ativação de mecanismos termorreguladores. Para bubalinos, a zona termoneutra se encontra entre 15,5 e 21,2°C (GOSWAMI e NARAIN, 1962).

Entretanto, os bubalinos possuem particularidades estruturais específicas, como alta concentração de melanina na pele e no pelo, reduzido número de glândulas sudoríparas e baixa densidade de pelos, características que os tornam mais sensíveis à radiação solar e ao estresse térmico pelo calor (GARCIA, 2013). O estresse térmico é qualquer combinação de condições ambientais que torne a temperatura ambiental mais elevada que a faixa de temperatura da zona termoneutra dos animais (THATCHER et al., 2010). A exposição dos animais a um ambiente térmico desfavorável causa aumento do calor endógeno acima do calor eliminado, levando à alteração de parâmetros fisiológicos, como frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR). Estes parâmetros funcionam como elementos de avaliação do equilíbrio térmico animal (FURTADO et al., 2012). No estresse térmico, inicialmente ocorre sudorese e vasodilatação periférica, a qual resulta em queda da pressão arterial, compensada pelo aumento da FC e posterior elevação da FR (AGGARWAL e SINGH, 2008; MARAI e HAEED, 2010b).

Variáveis Fisiológicas

Quando submetidos ao estresse calórico, os bubalinos ativam seus mecanismos fisiológicos de dissipação de calor (termólise), com objetivo de manter sua homeotermia. Contudo, dependendo da intensidade do estresse calórico, podem apresentar hipertermia, indicando que esses mecanismos termolíticos foram insuficientes para dissipação do excesso de calor acumulado (GUDEV et al., 2007a). Assim, pelo fato de denotar o resultado do balanço de energia térmica, a TR é um indicador melhor de estresse térmico do que a FR e FC (SILVA et al., 2011).

A TR média de bubalinos aumenta com o decorrer do dia, sendo menor ao amanhecer e mais elevada ao entardecer (BARROS et al., 2016). Ao longo do dia, búfalos apresentam médias de TR de 38,6°C às 6h00, de 38,8°C às 12h00 e de 39,0°C às 18h00 (LOURENÇO JÚNIOR, 1998). Em região de clima tropical úmido, bezerros bubalinos apresentam TR de 38,5°C, de 38,9°C e 39,3°C nos horários de 6h00, 12h00 e 18h00, respectivamente. Contudo, nos meses de elevada precipitação pluvial e maior nebulosidade, a TR registrada para

bezerros decaí levemente, sendo de 38,3°C, 38,6°C e 39,0°C, nos respectivos horários (MORAES JÚNIOR et al., 2010).

Na Amazônia, a subdivisão climática dos períodos do ano é comum, com base nas condições meteorológicas observadas. O período considerado “mais chuvoso” se estende de janeiro a abril, e é caracterizado por forte intensidade de chuvas e redução do potencial de horas de insolação, devido à diminuição da concentração de nuvens. No período dito “menos chuvoso”, que vai de agosto a dezembro, ocorre estiagens de duração variável, com menor nebulosidade. O período de “transição”, que compreende os meses de maio a julho, representa a passagem entre o fim do período mais chuvoso e o início do menos chuvoso (BASTOS et al. 2002; MORAES et al. 2005). Na região Amazônica, observa-se que a TR de búfalas criadas com acesso à sombra apresenta maiores valores às 13h00 em comparação às 7h00 no período mais chuvoso, de transição e menos chuvoso, sendo de 38,6°C, 38,6°C e 38,4°C e de 38,4°C, 38,4°C e 38,2°C, respectivamente, além dos valores mais altos no período mais chuvoso e de transição (SILVA et al., 2011). Para amenizar os efeitos do ambiente térmico sobre os bubalinos, o sombreamento natural das pastagens pode funcionar como uma estratégia interessante. Fêmeas bubalinas criadas na Amazônia, com acesso à sombra nas pastagens, apresentam menor TR que aquelas mantidas a pleno sol (38,6 e 38,8°C, respectivamente), diferença evidenciada no turno da tarde (SILVA et al., 2010a).

A manutenção da temperatura corporal visa evitar grandes elevações térmicas que possam ser deletérias ao metabolismo do animal. No estresse térmico, a FR apresenta-se mais elevada, antes mesmo do aumento da TR (FERREIRA et al., 2006). A FR de bubalinos, em condição de clima tropical, observada às 6h00, 12h00 e 18h00 é de 18, 24 e 18 mov/min, respectivamente (LOURENÇO JÚNIOR, 1998). Como os bubalinos possuem baixa eficiência na perda de calor pelas vias cutâneas, a perda através do ar expirado assume um importante papel ao ser comparado à transpiração (GUIMARÃES et al., 2001; GUDEV et al., 2007b). Na Amazônia brasileira, touros bubalinos manejados em central de inseminação artificial apresentaram menor FR no período mais chuvoso do ano (21-23mov/min) e maiores valores no período de transição (23-30 mov/min) (BARROS et al., 2015).

Também na Amazônia, observa-se que búfalas apresentam FC de manhã inferior à tarde nos períodos mais chuvoso (61,1 e 65,5 bat/min), de transição (54,5 e 63,2 bat/min) e menos chuvoso (55,5 e 58,1 bat/min) do ano (SILVA et al., 2011). A elevação da FC observada no período mais chuvoso pode ser devida ao aumento da umidade relativa do ar que ocorre neste período (MARAI et al., 2009).

A temperatura da superfície (TS) dos animais sofre influência direta do ambiente térmico, o que afeta as trocas térmicas através da pele (MEDEIROS et al., 2001). Para a manutenção da homeotermia, a pele exerce importante papel, pois através da mesma ocorre perda de calor por sudorese (SILVA et al., 2010a). Essa perda depende do gradiente de temperatura entre a superfície do corpo dos animais e o microambiente que os circundam. Desse modo, a avaliação da TS fornece informações sobre o balanço térmico animal, sendo uma medida de fácil obtenção, associada à TR e FR (PERISSINOTTO et al., 2006; MALAMA et al., 2013). A TS também se correlaciona às variáveis climáticas e pode ser utilizada como indicador do estresse térmico em bubalinos (COLLIER et al., 2006; SILVA et al., 2011). Na Amazônia, constatou-se que búfalas apresentam maiores valores de TS à tarde e no período menos chuvoso do ano, sendo que a TS apresenta alta correlação com variáveis climáticas, sendo positiva com temperatura ambiente e negativa com a umidade relativa do ar (SILVA et al., 2015a).

Variáveis Climáticas

Os bubalinos são sensíveis às altas temperaturas do ar, principalmente quando esta se apresenta associada a elevada umidade relativa e intensa radiação solar direta (MARAI e HAEEB, 2010b). Isso representa um ambiente térmico desafiador (GARCIA, 2013) e ocasiona redução no desempenho produtivo e reprodutivo (SILVA et al., 2015b). Sob condição de clima tropical úmido, esses animais são sujeitos a maior estresse térmico no período menos chuvoso do ano, principalmente no turno da tarde, devido aos maiores valores de temperatura e umidade relativa do ar (SILVA et al., 2011).

Uma das variáveis climáticas com maior influência sobre o ambiente em que o animal se encontra é a temperatura do ar (GARCIA, 2013). Bubalinos expostos às temperaturas ambientais iguais ou superiores a 36°C, a alta umidade do ar e a radiação solar direta, apresentam aumento da TR, FR e FC, sendo caracterizado o estresse calórico, mesmo quando são capazes de eliminar o excesso de calor corporal pelas vias evaporativas (DANTAS et al., 2008). A exposição dos animais às altas temperaturas ambientais promove um aumento do fluxo sanguíneo do núcleo central para as regiões periféricas do corpo, na tentativa de eliminar o calor interno, contribuindo para a elevação da TS (SILVA et al., 2011). Em bubalinos, o aumento da temperatura ambiente de 29,1 para 33,4°C eleva a TR de 38,3 para 39,1°C, bem como a FR, que passa de 59,0 para 62,5 mov/min (GUIMARÃES et al., 2001). A exposição de touros bubalinos a elevada temperatura ambiente pode ocasionar alteração da

qualidade seminal, sendo esta dependente da época do ano (GARCIA, 2006). No Estado do Pará, a qualidade seminal de touros bubalinos apresentou-se superior no período mais chuvoso quando comparado ao menos chuvoso (VALE, 1994).

A umidade relativa é outra variável que influencia no balanço calórico em ambientes quentes, no qual a perda de calor por evaporação é crucial à homeotermia (HERRERO et al., 2008). Para a manutenção de animais domésticos, a umidade relativa ideal encontra-se entre 50 a 70% (BAÊTA e SOUZA, 1997). A alta e a baixa umidade são igualmente prejudiciais à saúde animal, quando associadas à temperatura muito elevada. Caso o ambiente seja quente e muito seco, a evaporação é rápida, causando irritação cutânea e desidratação geral. Caso seja quente e muito úmido, a evaporação é lenta ou nula, reduzindo a termólise e aumentando o calor corporal, principalmente porque em alta temperatura ambiental, a termólise por convecção é prejudicada (SILANIKOVE, 2000; STARLING et al., 2005).

A temperatura do ar e a umidade relativa podem influenciar negativamente a qualidade seminal (SANTOS et al. 2014). Entretanto, quando medidas de manejo ambiental são tomadas, como fornecimento de sombreamento natural, a qualidade do sêmen de bubalinos criados na Amazônia não apresenta alterações significativas no volume, concentração, motilidade espermática, integridade da membrana plasmática, bem como nos defeitos maiores, menores e totais (BARROS et al., 2015).

Dependendo da intensidade e duração da radiação solar direta sobre os animais, estes apresentam alterações em seus parâmetros fisiológicos. A tolerância à radiação solar direta está em função de características físicas, tais como a cor do pelo e da pele, que nos búfalos, por ser escura, os tornam mais sensíveis (ROBERTO et al., 2010). A radiação solar também interfere na TS dos animais, elevando seu valor e alterando os gradientes térmicos entre o núcleo central e superficial corporal, a superfície e o meio ambiente, dificultando o processo termorregulatório (MEDEIROS et al., 2001). Por estes motivos, práticas de manejo que evitem a exposição dos animais à intensa radiação solar direta, facilitando mecanismos de perda de calor corporal, são necessárias.

Índices de Conforto Térmico Animal

Os índices de conforto térmico têm sido comumente utilizados para melhor avaliar o impacto ambiental sobre os animais. Dentre estes índices, destacam-se o Índice de

Temperatura e Umidade (ITU) e o Índice de Conforto de Benezra (ICB) (MORAES JÚNIOR et al., 2010).

O ITU é calculado associando-se a temperatura do ar e a umidade relativa do ar, constituindo um excelente indicador de conforto térmico animal (AZEVEDO, 2005). O ITU ≤ 74 é considerado como o mais adequado para criação de búfalos (SOMPARN et al., 2004). Entretanto para bubalinos, em regiões tropicais, o desconforto térmico é maior quando o ITU atinge 85 (ABLAS et al., 2007). Na criação de bezerros bubalinos em região de clima tropical, o ITU de 78,9 não ocasionou alteração dos parâmetros fisiológicos (MORAES JÚNIOR et al., 2010). Sabe-se, também, que com ITU entre 74,3 e 78,4, touros bubalinos podem não apresentar nenhum sinal de desconforto térmico, quando protegidos da radiação solar direta (BARROS et al., 2015). Em bovinos, o ITU de 83,8 reduziu a qualidade seminal, afetando negativamente o movimento de massa, a morfologia e o vigor espermático (MENEGASSI et al., 2015). O ITU apresenta correlação negativa significativa com a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (-0,17) (BARROS et al., 2015).

O ICB foi desenvolvido para a avaliação do conforto térmico de animais criados em condição de clima tropical. Em sua composição, contempla duas variáveis fisiológicas relevantes: a TR e a FR. Para valores do ICB próximos a dois (2,0), considera-se que os animais apresentam maior grau de adaptabilidade ao ambiente tropical e para valores maiores que dois, os animais apresentam dificuldades adaptativas (BENEZRA, 1954). Para bezerros bubalinos, o ICB médio de 2,9 não indica características físicas e comportamentais compatíveis a estresse térmico (MORAES JÚNIOR et al., 2010). Na Ilha de Marajó, bubalinos adultos apresentaram ICB de 1,7 no período chuvoso e de 1,9 no período seco (LOURENÇO JÚNIOR, 1998). Fêmeas leiteiras bubalinas criadas em sistema silvipastoril apresentaram ICB de 2,0 (GARCIA et al., 2011). Búfalas leiteiras criadas sem e com acesso a sombra apresentaram ICB de 2,0 e 2,2, com taxas de concepção na inseminação artificial em tempo fixo de 43,33% e 53,84%, respectivamente (GARCIA et al., 2007). Na Amazônia, novilhas bubalinas apresentaram maior ICB no turno da manhã (2,2) em relação a tarde (2,4), o que provavelmente está associado à menor temperatura do ar e a menor incidência de radiação solar durante a manhã (SILVA et al., 2010b). Por ser um indicador calculado pelo monitoramento de variáveis fisiológicas, o ICB é altamente correlacionado à FR (0,97) e à FC (0,89) (BARROS et al., 2015).

Lipídeos Dietéticos para Ruminantes

A incorporação de ácidos graxos nas dietas dos ruminantes tem sido uma das estratégias para incrementar o aporte de energia aos animais, pois estes compostos apresentam potencial energético 2,5 vezes maior que os carboidratos, sendo capazes de melhorar o balanço energético e, como consequência, o desempenho reprodutivo dos animais (CAVALIERI et al., 2005). Diferentes fontes lipídicas têm sido utilizadas na dieta de ruminantes, buscando melhorar sua função reprodutiva e, nesse contexto, os ácidos graxos derivados de plantas e sementes oleaginosas têm recebido especial destaque (ADEEL et al., 2009).

Na suplementação de ruminantes com ácidos graxos polinsaturados (PUFAS), deve-se considerar o alto poder redutor do meio ruminal. Pois, durante a biohidrogenação que ocorre no rúmen, os PUFAS contidos na dieta são convertidos em ácidos graxos saturados, devido à redução de suas ligações duplas, pela atividade dos microorganismos ruminais (GREGORY et al., 2009). Entretanto, apesar da intensa biohidrogenação ocorrida no rúmen, os níveis de PUFAS aumentam em vários tecidos após a suplementação, inclusive nas gônadas (BILBY et al., 2006). A adição de lipídeos na dieta de ruminantes não deve exceder 4 a 7% do consumo de matéria seca, sob pena de haver redução na eficiência dos microorganismos ruminais, com efeito negativo sobre sua habilidade na digestão da fibra (PALMQUIST, 1994).

A inclusão de resíduos ou coprodutos agroindustriais na alimentação de ruminantes é uma alternativa para minimizar os custos de produção, uma vez que a alimentação representa a maior parcela destes custos. Pode também apresentar características nutricionais favoráveis à alimentação animal, além de ser um destino socioeconômico e ambiental para esses resíduos (NUNES et al., 2007; SANTOS et al., 2014).

O Brasil tem investido na plantação de dendê, também conhecido como palma de óleo, objetivando a produção de óleo para uso alimentar e fabricação de biocombustíveis. O Estado do Pará é o maior produtor brasileiro de palma de óleo, respondendo por 90% da produção nacional, com 54.475 mil hectares de área plantada e produção anual de 1.040.538 toneladas (IBGE, 2014). Na Amazônia, concentra-se uma elevada produção desse óleo e de seus resíduos agroindustriais durante todo o ano (SILVA et al., 2014). Sendo assim, em virtude da disponibilidade desses produtos, os mesmos devem ser considerados, ao menos localmente, como alternativas para a alimentação de ruminantes.

Suplementação Lipídica e Reprodução

A suplementação alimentar com PUFAS influencia positivamente a reprodução, determinando diferentes concentrações dos mesmos na composição da membrana plasmática espermática (GREGORY et al., 2009). Isso melhora a fluidez, estabilidade, permeabilidade e integridade das membranas, e tem reflexos positivos na motilidade, viabilidade e capacitação espermática (STILLWELL e STEPHEN, 2003; ROBINSON et al., 2006). Além disso, os ácidos graxos dietéticos produzem significativos impactos nos níveis de lipídeos circulantes e do colesterol, o qual é precursor de hormônios esteroides importantes para o processo de maturação sexual e espermatogênese (MANJUNATH e THERIEN, 2002; VAN GESTEL et al., 2005). Proporções relativamente baixas de colesterol e elevadas de PUFAS nos espermatozoides são sugeridas para melhorar o processo de capacitação espermática, reação acrossomal e criopreservação (LENZI et al., 2000; FURLAND et al., 2007; SAEZ et al., 2011).

A criopreservação diminui significativamente a proporção de lipídeos nos espermatozoides de touros bubalinos (EJAZ et al., 2014). Em suínos, esta redução foi relacionada ao aumento de espermatozoides com reação acrossomal e diminuição da motilidade (MALDJIAN et al., 2005). Além disso, as membranas espermáticas são extremamente sensíveis às crioinjúrias (SELVARAJU et al., 2008). A criopreservação reduz a integridade da membrana plasmática, de 80,2% após a diluição para 32,6% após a criopreservação (RASUL et al., 2001). As crioinjúrias ocorrem devido a alterações na temperatura e osmolaridade do meio, provocando mudanças morfológicas na organização e composição lipídica das membranas, reduzindo a capacidade espermática fertilizante (SALAMON e MAXWELL, 2000; SILVA e GADELLA, 2006; ANDRABI, 2009). A reduzida criotolerância dos espermatozoides bubalinos em comparação a dos bovinos é atribuída às variações no conteúdo de PUFAS em sua membrana plasmática (SANSONE et al., 2000; RASUL et al., 2001). Por isso, o aumento na proporção de PUFAS confere maior fluidez e integridade devido à presença de duplas ligações, proporcionando à membrana maior resistência à formação de cristais de gelo que ocorre durante a criopreservação (CEROLINI et al., 2003; WATERHOUSE et al., 2006), e causar em espermatozoides bubalinos alteração na motilidade e morfologia do acrossoma (KUMAR et al., 2011).

Os principais PUFAS encontrados nos espermatozoides bubalinos são o ácido linolênico (ômega-3 - ω 3) e o ácido linoléico (ômega-6 - ω 6), os quais constituem mais de

70% do total dos ácidos insaturados (JAIN e ANAND, 1976; DOLATPANAH et al., 2008). O ácido linolênico e o ácido linoléico são considerados essenciais por não serem sintetizados no organismo animal, devendo ser supridos na dieta (POMPEIA et al., 2000). São metabolizados pelo organismo, mediante uma sequência de reações enzimáticas, e convertidos em metabólitos ativos, como o ácido araquidônico, ácido docosahexaenoico e ácido eicosapentaenoico, que estão envolvidos na fisiologia da membrana (SALEM et al., 2001; MOALLEM et al., 2015). O ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico e ácido linolênico são os principais PUFAS das membranas celulares (FAROOQUI et al., 2000), sendo que o ácido docosahexaenoico representa em torno de 55% do total de ácidos graxos detectados nos espermatozoides de ruminantes (PETERS e BALL, 2004). Tem-se sugerido que o ácido docosahexaenoico exerce um papel importante nos mecanismos fisiológicos e moleculares que controlam a fluidez da membrana espermática, pois o seu elevado teor na membrana aumenta sua fluidez e elasticidade (GHOLAMI et al., 2010).

A relação entre ácido linolênico e ácido linoléico nos diferentes tipos de lipídeos adicionados às dietas pode ser o principal responsável pela qualidade do sêmen (MAGGIONI et al., 2008). A suplementação com ácido linolênico modifica a composição lipídica dos espermatozoides de touros, principalmente pela elevação na proporção do ácido docosahexaenoico (MITRE et al., 2004; CEROLINI et al., 2006). A adição de óleo de palma na dieta de bubalinos influenciou positivamente a cinética espermática, com elevação na habilidade de progressão dos espermatozoides (GONÇALVES et al., 2014). A suplementação de bubalinos com óleo de palma não alterou a maioria dos parâmetros seminais, com exceção do turbilhonamento espermático e integridade da membrana plasmática, que sofreram pequena redução, todavia nenhum valor foi observado abaixo do fisiológico (SILVA et al., 2014).

Em touros bubalinos, o ciclo espermatogênico tem duração média de 8,6 dias, levando-se em consideração que normalmente ocorrem 4,5 ciclos, tem-se uma média de 38,7 dias para a espermatogênese. Além disso, o tempo de armazenamento epididimário é, em média, de 9,3 dias (FRANÇA et al., 2005). Durante a espermatogênese e a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo, ocorrem mudanças na composição da membrana plasmática espermática. Portanto, para a avaliação da influência de determinado suplemento em touros, deve ser considerado o tempo necessário para que ocorra a espermatogênese (SENGER, 2003; ROBINSON et al., 2006). A maior concentração lipídica favorece as espermatogônias durante a fase inicial de gametogênese e é necessária nos processos de meiose e diferenciação dos

espermatócitos (SCHENK e HOEGGER, 2010). Por isso, a adição de óleo de palma na alimentação de bubalinos causou alteração nas características seminais somente a partir da segunda espermatogênese completa sob efeito da dieta, ou seja, 90 dias após o início da suplementação (GONÇALVES et al., 2014). Isso é interessante quando se considera que em touros bubalinos o ciclo espermatogênico completo e o tempo de armazenamento epididimário têm duração média de 48 dias (FRANÇA et al., 2005).

Com a adição de óleo e semente de girassol na dieta de touros bubalinos, foi observado aumento da motilidade e na percentagem de espermatozoides com membrana íntegra e funcionalmente ativa após a criopreservação (ADEEL et al., 2009). A suplementação com ácido docosahexaenoico e ácido eicosapentaenoico aumentou nos espermatozoides bovinos a concentração de ácido linolênico. Entretanto, a motilidade espermática foi maior no grupo suplementado com ácido linolênico, e a adição de ácido graxo saturado aumentou a concentração espermática no sêmen criopresevado (MOALLEM et al., 2015).

Touros bubalinos apresentaram maior concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL) quando suplementados com farelo de coco (1,6) em comparação a torta de amêndoa de dendê (1,0). No entanto, maiores valores de motilidade espermática e integridade de membrana plasmática foram observados nos animais que receberam a torta de amêndoa de dendê (71,7% e 82,1%) em relação ao farelo de coco (56,7% e 72,0%). Além disso, a ingestão lipídica apresentou correlação positiva com a motilidade (0,34) e integridade de membrana plasmática (0,35) (SANTOS et al., 2014).

Considerações Finais

Apesar dos bubalinos serem animais adaptados a condições adversas, necessitam da implantação de adequadas medidas de manejo ambiental e nutricional que levem à exacerbação do seu potencial produtivo e reprodutivo. Contudo, é de fundamental importância o esforço conjunto de pecuaristas e cientistas na adoção de estratégias que proporcionem conforto térmico e aumento da reserva energética, a fim de elevar a produtividade dos sistemas de criação de bubalinos na Amazônia.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo apoio financeiro (Projetos PECUS-01100600107 e BIOTEC-01130600103), à Universidade Federal do Pará e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Referências Bibliográficas

ABLAS, D. S.; TITTO, E. A. L.; PEREIRA, A. M. F.; TITTO, C. G.; LEME, T. M. C. Behaviour of grazing water buffaloes depending on the availability of shade and water for immersion. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 2, p. 167-175, 2007.

ADEEL, M.; IJAZ, A.; ALEEM, M.; REHMAN, H.; YOUSAF, M. S.; JABBAR, M. A. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Theriogenology*, v. 71, p. 1220-1225, 2009.

AGGARWAL, A.; SINGH, M. Changes in skin and rectal temperature in lactating buffaloes provided with showers and wallowing during hot-dry season. *Tropical Animal Health and Production*, v. 40, p. 223-228, 2008.

ANDRABI, S. M. H. Factor affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p. 552-569, 2009.

AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M.; LANA, A. M. Q.; SAMPAIO, I.B.M.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, $\frac{7}{8}$ Holandês-Zebu em lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2000-2008, 2005.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. *Ambiência em edificações rurais conforto térmico*. Viçosa, UFV. Universidade de Viçosa. 1997. 246p.

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.

BARROS, D. V.; SILVA, L. K. X.; LOURENÇO JR., J. B.; SILVA, A. O. A.; SILVA, A. G. M.; 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, p. 805-813, 2015.

BARTH, A. D.; BRITO, L. F.; KASTELIC, J.P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*, v. 70, p. 485-494, 2008.

BASTOS, T. X.; PACHECO, N. A.; NECHET, D.; SÁ, T. D. A. *Aspectos climáticos de Belém nos últimos cem anos – Belém: Embrapa Amazônia Oriental*. 2002. 31p.

BENEZRA, M. V. A new index measuring the adaptability of cattle to tropical conditions. *Journal of Animal Science*, v. 13, n. 4, p. 1015, 1954.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BILBY, T. R.; JENKINS, T.; TAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Pregnancy, bST and omega-3 fatty acids in lactating dairy cows: III Fatty acid distribution. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 3386-3399, 2006.

CAVALIERI, F. L. B.; SANTOS, G. T.; SILVA, D. C.; RIGOLON, L. P.; DAMASCENO, J. C.; CAPOVILLA, L. C.; BETINI, C. M.; RAMOS, F. S.; PETIT, H. V. Milk production and milk composition of dairy cows fed lac 100® or whole flaxseed. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 85, p. 413-416, 2005.

CEROLINI, S.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; MALDJIAN, A.; ZANIBONI, L.; PARODI, L. Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: A review. *World's Poultry Science Journal*, v.59, p.65-75, 2003.

CEROLINI, S.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T. Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, v. 66, p. 877-886, 2006.

COLLIER, R. J.; DAHL, G. E.; VAN BAALE, J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 1244-1253, 2006.

DANTAS, J. A. S.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; MONTEIRO, E. M. M.; SANTOS, N. F. A.; AVIZ, M. A. B.; COSTA, D. A. Climatic variable vs. conception of buffalos in the Amazon. *Archivos de Zootecnia*, v. 57, n. 219, p. 349-351, 2008.

DOLATPANAH, M. B.; TOWHIDI, A.; FARSHAD, A. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v. 21, p. 29-34, 2008.

EJAZ, R.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ULLAH, N.; HUSNA, A.U.; IQBAL, R.; AKHTER, S. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 122-125, 2014.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 106, p. 1-29, 2000.

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

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v. 63, p. 300-318, 2005.

FURLAND, N. E.; ORESTI, G. M.; ANTOLLINI, S. S.; VENTURINO, A.; MALDONADO, E. N.; AVELDANO, M. I. Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 18151-18161, 2007.

FURTADO, D. A.; PEIXOTO, A. P.; REGIS, J. E. F.; NASCIMENTO, J. W. B.; ARAUJO, T. G. P.; LISBOA, A. C. C. Termorregulação e desempenho de tourinhos Sindi e Guzerá, no Agreste Paraibano. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, p. 1022-1028, 2012.

- GARCIA, A. R. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 37, p. 121-130, 2013.
- GARCIA, A. R. Influence of environmental factors on reproductive characteristics of the river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Revista de Ciências Agrárias*, v. 45, p. 1-15, 2006.
- GARCIA, A. R.; MATOS, L. B.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; NAHÚM, B. S.; ARAÚJO, C. V.; SANTOS, A. X. Variáveis fisiológicas de búfalas leiteiras criadas sob sombreamento em sistemas silvipastoris. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, p. 1409-1414, 2011.
- GARCIA, A.R.; MATOS, L.B.; NAHÚM, B.S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; GONÇALVES, K.S.; MIYASAKI, M. Y. A. Importância de sistemas silvipastoris no conforto térmico de búfalas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 59, 2007, Belém. *Anais...* São Paulo:SBPC/UFPA, 2007.
- GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M. H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology*, v. 74, p. 1548-1558, 2010.
- GONÇALVES, A. A.; GARCIA, A. R.; ARRUDA, R. P.; BARIONI JUNIOR, W.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; KAHWAGE, P. R.; SILVA, G. R. A suplementação alimentar com ácidos graxos insaturados melhora a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*) pós descongelação. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, p. 2467-2484, 2014.
- GOSWAMI, S. B.; NARAIN, P. The effect of air temperate and relative humidity on some physiological indices of buffalo bulls (*Bubalus bubalis* L.). *The Indian Journal of Veterinary Sciences*, v. 33, p. 112, 1962.
- GREGORY, R. M.; CARDONA, J. C. A.; OSPINA, H. P.; RAMIREZ, M. H.; MATTOS, R. C.; JOBIM, M. I. M. Ácidos graxos poliinsaturados e seus efeitos no desempenho reprodutivo da vaca. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 6, p. 153-156, 2009.
- GUDEV, D.; POPOVA-RALCHEVA, S.; MONEVA, P.; ALEKSIEV, Y.; PEEVA, T.; ILIEVA, Y.; PENCHEV, P. Effect of heat-stress on some physiological and biochemical parameters in buffaloes. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, p. 1325-1328, 2007a.

GUDEV, D.; POPOVA-RALCHEVA, S.; MONEVA, P.; ALEKSIEV, Y.; PEEVA, T.; PENCHEV, P.; ILIEVA, Y. Physiological indices in buffaloes exposed to sun. *Archiva Zootechnica*, v. 10, p. 127-133, 2007b.

GUIMARÃES, C. M. C.; FALCO, J. E.; TITTO, E. A. L.; NETO, R. F.; MUNIZ, J. A. Termorregulação em bubalinos submetidos a duas temperaturas de ar e duas proporções de volumoso:concentrado. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, p. 437-443, 2001.

HERRERO, M.; HANOTTE, O.; NOTENBAERT, A.; THORNTON, P. K. *Potential of modeling animal genetic resources data in relation to other existing data sets*. Report on the FAO/WAAP workshop on production environment descriptors for animal genetic resources report. Eds. Pilling, D.; Rischkowsky, B.; Scherf, B.; Caprarola, Italy, p.6-8, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2>>. Acesso em 02/03/2016.

JAIN, Y. C; ANAND, S. R. Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminal plasma and sperm lipid. *The Journal of Society for Reproduction and Fertility*, v. 47, p. 261-267, 1976.

KUMAR, R.; JAGAN, M. G.; ARVIND, A. S. K. Freeze-thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. *Molecular Biology Reports*, v. 38, p. 1499-1506, 2011.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Frontiers in Bioscience*, v. 5, p. 1-15, 2000.

LOURENÇO JÚNIOR, J. B. *Production, physiology and behavior of zebu cattle or buffaloes and physical environmental factors in pasture on the island of Marajó*. 1998. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Pará, Belém.

MAGGIONI, D. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. *Pubvet*, v. 2, n. 11, 2008.

MALAMA, E.; BOLLWEIN, H.; TAITZOGLU, I. A.; THEODOSIOU, T.; BOSCOS, C. M.; KIOSSIS, E. Chromatin integrity of ram spermatozoa. Relationships to annual fluctuations of scrotal surface temperature and temperature-humidity index. *Theriogenology*, v. 80, p. 533-541, 2013.

MALDJIAN, A.; PIZZIC, F.; GLIOZZIC, T.; CEROLINIB, S.; PENNYA, P.; NOBLEA, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, v. 63, p. 411-421, 2005.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, p. 109-119, 2002.

MARAI, I. F. M.; DAADER, A. H.; SOLIMAN, A. M.; EL-MENSHAWY, S. M. S. Non-genetic factors affecting growth and reproduction traits of buffaloes under dry management housing (in sub-tropical environment) in Egypt. *Livestock Research for Rural Development*, v. 21, n.3. p. 1-13, 2009.

MARAI, I. F. M.; EL-DARAWANY, A. A.; FADIEL, A.; ABDEL-HAFEZ, M. A. M. Physiological traits as affected by heat stress in sheep: a review. *Small Ruminant Research*, v. 71, p. 1-12, 2007.

MARAI, I. F. M.; HABEEB, A. A. M. Buffaloes reproductive and productive traits as affected by heat stress. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v. 12, n. 2, p. 193-217, 2010a.

MARAI, I. F. M.; HAEEB, A. A. M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress: a review. *Livestock Science*, v. 127, p. 89-109, 2010b.

MEDEIROS, L. F. D.; VIEIRA, D. H.; OLIVEIRA, C. A.; SCHERER, P. O. Frequências respiratória e cardíaca em caprinos de diferentes raças e idades. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 23, p. 199-202, 2001.

MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J.; DIAS, E. A.; KOETZ J. R. C.; PEREIRA, G. R.; PERIPOLLI, V.; MCMANUS, C.; CANOZZI, M. E. A.; 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, p. 357-364, 2015.

MITRE, R.; CHEMINADE, C.; ALLAUME, P.; LEGRAND, P.; LEGRAND, A. Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. *Theriogenology*, v. 62, p. 1557-1566, 2004.

MOALLEM, U.; NETA, N.; ZERON, Y.; ZACHUT, M.; ROTH, Z. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 83, p. 1110-1120, 2015.

MORAES JÚNIOR, R. J.; GARCIA, A. R.; SANTOS, N. F. A.; NAHÚM, B. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; ARAÚJO, C. V.; COSTA, N. A. Conforto ambiental de bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) em sistemas silvipastoris na Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, v. 40, p. 629-649, 2010.

MORAES, B. C.; COSTA, J. M. N.; COSTA, A. C. L.; COSTA, M. H. Variação espacial e temporal da precipitação no estado do Pará. *Acta Amazonica*, v. 35, p. 207-214, 2005.

NUNES, H.; ZANINE, A. M.; MACHADO, T. M. M.; CARAVALHO, F. C. Alimentos alternativos na dieta de ovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, v. 15, n. 4, p. 141-151, 2007.

PALMQUIST, D. L. The role of dietary fats in efficiency of ruminants. *Journal of Nutrition*, v. 124, p. 1377-1382, 1994.

PERISSINOTTO, M.; MOURA, D. J.; MATARAZZO, S. V.; SILVA, I. J. O.; LIMA, K. A. O. Efeito da utilização de sistemas de climatização nos parâmetros fisiológicos do gado leiteiro. *Engenharia Agrícola*, v. 26, p. 663-671, 2006.

PETERS, A. R.; BALL, P. J. H. *Bull Fertility - Reproduction in Cattle*. 3^o Edition. Blackwell Publishing, 2004. p. 28-39.

POMPEIA, C.; LOPES, L. R.; MIYASAKA, C. K. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 1255-1268, 2000.

RANJAN, A.; SAHOO, B.; SINGH, V. K.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, S. P.; PATTANAIK, A.K. Effect of bypass fat supplementation on productive performance and blood biochemical profile in lactating Murrah (*Bubalus bubalis*) buffaloes. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, p. 1615-1621, 2012.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Change in motion characteristic, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, v. 22, p. 278-283, 2001.

ROBERTO, J. V. B.; SOUZA, B. B.; SILVA, A. L. N.; JUSTINIANO, S. V.; FREITAS, M. M. S. Parâmetros hematológicos de caprinos de corte submetidos a diferentes níveis de suplementação no semi-árido paraibano. *Revista Caatinga*, v. 23, p. 127-132, 2010.

ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; MITCHELL, L. M.; MCEVOY, T. G. Nutrition and fertility in ruminant livestock animal. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, p. 259-276, 2006.

SAEZ, F.; OUVRIER, A.; DREVET, J. R. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian Journal of Andrology*, v. 13, p. 11-17, 2011.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALEM, J. R. N.; BURTON, L.; HEE-YONG, K.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, v. 36, p. 945-959, 2001.

SANSONE, G.; NASTRI, M. J.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 55-76, 2000.

SANTOS, A. X.; KAHWAGE, P. R.; FATURI, C.; NAHÚM, B. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; JOELE, M. R. S. P.; GARCIA, A. R. Feed supplementation with palm kernel cake-based concentrate increases the quality of water buffalo semen. *Animal Reproduction*, v. 11, p. 85-95, 2014.

SCHENK, S.; HOEGER, U. Lipid accumulation and metabolism in polychaete spermatogenesis: Role of the large discoidal lipoprotein. *Molecular Reproduction and Development*, v. 77, p. 710-719, 2010.

SELVARAJU, S.; RAVINDRA, J. P.; GHOSH, J.; GUPTA, P. S. P.; SURESH, K. P. Evaluation of sperm functional attributes in relation to in vitro sperm-zona pellucida binding ability and cleavage rate in assessing frozen thawed buffalo (*Bubalus Bubalis*) semen quality. *Animal Reproduction Science*, v. 106, p. 311-321, 2008.

SENGER, P. L. *Pathways to pregnancy and parturition*. Second edition. Pullman, WA: Current Conceptions Inc; 2003.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science*, v. 67, p. 1-18, 2000.

SILVA, A. R. L.; SANTOS, N. F. A.; ARAÚJO, A. A.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B; GARCIA, A. R.; VIANA, R. B.; NAHÚM, B. S. Effect of the climatic conditions of the Brazilian Eastern Amazon in the tolerance to the heat in buffaloes (*Bubalus bubalis*) created on the shading and sun. *Revista Veterinaria*, v. 21, Suplemento 1, 2010b.

SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; SOUSA, O. B.; SILVA, G. A.; FREITAS, M. M. S. Avaliação da adaptabilidade de caprinos ao semiárido através de parâmetros fisiológicos e estruturas do tegumento. *Revista Caatinga*, v. 23, p. 142-148, 2010a.

SILVA, G. R.; GARCIA, A. R.; FATURI, C.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; NAHÚM, B. S.; GONÇALVES, A. A.; KAWHAGE, P. R.; SILVA, L. H. M.; MENESES, A. M. C. Adição de óleo de palma na dieta sobre a lipídemia e a qualidade do sêmen de bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, p. 152-160, 2014.

SILVA, J. A. R.; ARAÚJO, A. A.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; SANTOS N. F. A.; GARCIA, A. R.; NAHÚM, B. S. Conforto térmico de búfalas em sistema silvipastoril na Amazônia Oriental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, p. 1364-1371, 2011.

SILVA, J. A. R.; ARAÚJO, A. A.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; SANTOS, N. F. A.; GARCIA, A. R.; OLIVEIRA, R. P. Thermal comfort indices of female Murrah buffaloes reared in the Eastern Amazon. *International Journal Biometeorology*, v. 59, p. 1261-1267, 2015a.

SILVA, J. A. R.; SANTOS, N. F. A.; ARAÚJO, A. A.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R.; ATHAÍDE, L. G.; NOGUEIRA, I. C. Termorregulação de búfalas ao sol e à sombra sob condições de clima amazônico. *Anais... XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia*. 2015b.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2006.

SOMPARN, P.; GIBB, M. J.; MARKVICHITR, K.; CHAIYABUTR, N.; THUMMABOOD, S.; VAJRABUKKA, C. Analysis of climatic risk for cattle and buffalo production in northeast Thailand. *International Journal Biometeorology*, v. 49, p. 59-64, 2004.

STARLING, J. M. C.; SILVA, R. G.; NEGRÃO, J. A.; MAIA, A. S. C.; BUENO, A. R. Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 2064-2073, 2005.

STILLWELL, W.; STEPHEN, R. W. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 126, p. 1-27, 2003.

THATCHER, W. W. Manejo de estresse calórico e estratégias para melhorar o desempenho lactacional e reprodutivo em vacas de leite. In: XIV Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos. *Anais...* Uberlândia. 2010. p. 2-25.

VALE, W. G. Collection processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo Journal*, v. 2, Supp 1, p. 65-81, 1994.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUSA, J. S.; SILVA, A. O. A.; BARBOSA, E. M.; ROLIM FILHO, S. T. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 2, p. 141-155, 2008.

VAN GESTEL, R. A.; BREWIS, I. A.; ASHTON, P. R.; HELMS, J. B.; BROUWERS, J. F.; GADELLA, B. M. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction*, v. 11, p. 583-590, 2005.

WATERHOUSE, K. E.; HOFMO, P. O.; TVERDAL, A.; MILLER, R. R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, v. 131, p. 887-894, 2006.

4. Artigo 2 – Padrões de temperatura de superfície escrotal, termorregulação testicular e qualidade seminal de touros búfalos criados em clima tropical

Patterns of scrotal surface temperature, testicular thermoregulation and semen quality of water buffalo bulls raised on tropical climate

Artigo a ser submetido ao Periódico *International Journal of Biometeorology*

Resumo

Objetivou-se avaliar o conforto térmico e suas consequências no padrão de temperaturas da superfície escrotal, na termorregulação testículo-escrotal e na qualidade seminal de touros bubalinos. O experimento foi realizado em região de clima tropical (Afi de Köppen) e compreendeu o período mais chuvoso, de transição e menos chuvoso do ano. Onze bubalinos foram mensalmente submetidos à avaliação da frequência respiratória (FR; mov/min), frequência cardíaca (FC; bat/min), temperatura retal (TR; °C), temperatura de globo ocular (TGO; °C) e temperaturas de superfície escrotal (TSE; °C), nos turnos da manhã e da tarde. Foram realizadas colheitas e avaliação seminal quinzenais. Foram calculados os índices de conforto térmico, representados pelo Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e Índice de Conforto de Benezra (ICB). ITU e ICB não apresentaram diferença significativa entre os períodos. FR e FC mantiveram-se mais elevadas no período de transição e à tarde. TR e TGO não apresentaram diferenças significativas. Foi observada maior temperatura de funículo espermático (TFE) e polo testicular dorsal (TPTD) no período menos chuvoso. Não foi observada diferença estatística na temperatura escrotal média (TEMed), mínima (TEMin), máxima (TEMax), polo testicular ventral (TPTV) e cauda do epidídimo (TCE). Gradientes calculados apresentaram-se positivos. Foi observado valor de mesma magnitude do ITU com TR, TGO e ICB, e de alta com TGO e TR. TGO apresentou correlação com TCE e TEMin. TCE e TEMin apresentaram correlações com volume, motilidade e integridade de membrana plasmática. Touros bubalinos apresentaram termogramas normais, não sendo constatadas alterações na termorregulação testículo-escrotal e na qualidade seminal.

Palavras-chave: Búfalos. Temperatura escrotal. Termorregulação escrotal. Conforto térmico. Termografia infravermelha. Qualidade seminal.

Abstract

This study aimed to evaluate the thermal comfort and its consequences on the pattern of temperatures scrotal surface, the testis-scrotal thermoregulation and semen quality of buffalo bulls. The experiment was conducted in tropical climate region (Afi to Koppen) and understood the rainiest period of transition and less rainy year. Eleven buffaloes were monthly submitted to the evaluation of respiratory rate (RR; mov/min), heart rate (HR, beats/min), rectal temperature (RT; C), eye globe temperature (TGO; ° C) and scrotal surface temperatures (TSE; ° C), the shifts in the morning and afternoon. Semen collections and evaluation were performed. The thermal comfort indexes were calculated and represented by the temperature and humidity index (THI) and Comfort Benezra Index (ICB). ITU and ICB did not differ significantly between periods. FR and FC remained higher during the transition period and in the afternoon. RT and TGO did not show significant differences. It was observed higher temperature of the spermatic cord (TFE) and dorsal testicular pole (TPTD) in less rainy period. There was no statistical difference in scrotal temperature average (TEMed), minimum (TEMin), maximum (TEMax), ventral testicular pole (TPTV) and of the epididymis tail (TEC). Thermal gradients were positive. It was observed value of the same magnitude of the ITU with TR, TGO and ICB, and high with TGO and TR. TGO presented correlated with TBI and Temin. TCE and TEmin showed correlations with volume, motility and plasma membrane integrity. Buffaloes bulls presented normal thermograms, and no changes were observed in testicular-scrotal thermoregulation and semen quality.

Keywords: Buffaloes, Scrotal temperatures, Scrotal thermoregulation, Thermal comfort, Infrared thermography, Semen quality.

Introdução

Os bubalinos são animais com sistema termorregulador eficiente, mas quando submetidos a altas temperaturas ambientais podem apresentar estresse calórico e redução na eficiência reprodutiva (Gudev et al. 2007; Marai et al. 2008). Quando saem de sua zona de termoneutralidade por efeito de variações climatológicas instantâneas ou mais duradouras, os animais acionam seus mecanismos termorregulatórios. A manutenção da temperatura corporal visa evitar grandes elevações térmicas que podem ser deletérias ao metabolismo. O desconforto térmico causa sudorese e vasodilatação periférica, a qual resulta em queda da

pressão arterial, compensada pelo aumento da frequência cardíaca (FC) e posterior elevação da frequência respiratória (FR) (Aggarwal and Singh 2008; Marai and Haebe 2010).

Nos mamíferos, as alterações climáticas podem interferir na homeotermia sistêmica, mas também afetam a termorregulação testículo-escrotal (Gabaldi and Wolf 2002). Por isso, a qualidade seminal de touros pode ser negativamente influenciada por fatores que reduzam seu conforto térmico, como elevadas temperatura do ar e umidade relativa (Santos et al. 2014). Para espécies animais com testículos localizados fora da cavidade abdominal, a elevação da temperatura escrotal reduz significativamente a qualidade seminal (Kastelic and Brito 2012). Em indivíduos com termorregulação menos eficiente, a elevação da temperatura ambiente está associada ao aumento da temperatura de superfície escrotal (TSE) e da temperatura interna testicular, e redução na qualidade seminal (Berry et al. 2011; Silva et al. 2011). Isso pode constituir um fator determinante na seleção de touros mais adaptáveis e férteis para uso em programas de melhoramento genético.

A TSE pode ser mensurada pela termografia infravermelha, um método rápido, preciso e não invasivo, que auxilia na avaliação andrológica e na compreensão da termorregulação testículo-escrotal de touros (Kastelic 2014; Menegassi et al. 2015). A TSE sofre redução a partir do polo testicular dorsal, originando o gradiente de temperatura testicular, o qual indica a diferença entre a temperatura dos polos dorsal e ventral dos testículos (Coulter et al. 1988; Kastelic et al. 1995). Em função dos distintos padrões de TSE observados em touros, estes podem ser classificados como portadores de um padrão normal, anormal ou questionável (Lunstra and Coulter 1997).

Nos bovinos, a qualidade seminal apresenta correlação negativa com TSE e positiva com o gradiente de temperatura testicular (Berry et al. 2011). Por isso, touros bovinos com termograma anormal apresentam menor gradiente de temperatura testicular e redução na qualidade seminal (Lunstra and Coulter 1997; Kastelic and Brito 2012; Menegassi et al. 2015). Contudo, informações mais detalhadas quanto à termólise testicular e o estabelecimento do gradiente térmico escrotal não são bem conhecidos nos bubalinos. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o conforto térmico e suas consequências no padrão de temperaturas da superfície escrotal, na termorregulação testículo-escrotal e na qualidade seminal de touros bubalinos em clima tropical, em diferentes períodos do ano.

Materiais e métodos

Local e Período Experimental

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), em Castanhal, Pará, Brasil (1°18' Sul e 47°56' Oeste). O clima local é tropical quente e úmido (Afi de Köppen), com precipitação pluviométrica média anual entre 2.300 e 2800 mm (Valente et al. 2001; Alvares et al. 2013), temperatura do ar média anual de 26 °C, umidade relativa do ar média de 86% e insolação anual de 2.400 horas (Bastos et al. 2002). As coletas de dados a campo ocorreram de abril a dezembro de 2014, sendo que o período experimental compreendeu os períodos mais chuvoso (abril e maio), de transição (junho a agosto) e menos chuvoso (setembro a dezembro) do ano.

A classificação em diferentes períodos ocorreu com base nas condições meteorológicas observadas. O período mais chuvoso é caracterizado por forte intensidade de chuvas e redução do potencial de horas de insolação, devido à diminuição da concentração de nuvens. No período menos chuvoso ocorrem estiagens de duração variável, com menor nebulosidade. O período de transição representa a transição entre o fim do período mais chuvoso e o início do menos chuvoso (Bastos et al. 2002; Moraes et al. 2005). O comportamento das variáveis climáticas mais relevantes durante os períodos experimentais está expresso na Tabela 1.

Tabela 1 Médias mensais dos valores registrados em estação meteorológica automática durante o período experimental, Castanhal, Pará, Brasil

Variável Climática	Período		
	Mais Chuvoso	Transição	Menos Chuvoso
Temperatura do ar (°C)	26,1	26,4	27,0
Umidade relativa (%)	83,9	79,5	74,9
Radiação solar global acumulada (kJ/m ²)	665,4	746,7	786,8
Precipitação pluviométrica acumulada (mm)	237	169	140

Bioética e Animais Experimentais

Todos os procedimentos realizados com animais neste estudo foram praticados de acordo com os padrões de bioética em experimentação animal e o protocolo adotado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais da Embrapa (Declaração CEUA/CPATU 02/2015).

Onze touros bubalinos adultos (55 ± 9 meses; $701,4 \pm 82,8$ kg) da raça Murrah foram usados (Anexo A). Os animais eram clinicamente saudáveis e foram submetidos às mesmas condições nutricionais e ambientais, sendo mantidos em baias coletivas não cobertas, com acesso à sombra. Os animais tinham acesso *ad libitum* à água e ao cocho, sendo a alimentação ofertada diariamente em dois horários (08h00 e 16h00). A alimentação foi composta por volumoso (forragem triturada de capim-elefante, *Pennisetum purpureum*), concentrado (composto por farelo de trigo e resíduo de feijão) e sal mineral. A oferta diária de concentrado era ajustada para 1% do peso vivo. Antes do início do período experimental, os animais foram submetidos por 30 dias à adaptação ao manejo intensivo e alimentar.

Delineamento Experimental

O experimento foi desenvolvido de abril a dezembro, e compreendeu três períodos: mais chuvoso (abril e maio), de transição (junho a agosto) e menos chuvoso (setembro a dezembro). Os animais foram submetidos mensalmente à avaliação de frequência respiratória (FR; mov/min), frequência cardíaca (FC; bat/min), temperatura retal (TR; °C), temperatura de globo ocular (TGO; °C) e temperaturas de superfície escrotal (TSE; °C), nos turnos da manhã e tarde. A cada 15 dias foram realizadas colheitas de sêmen de todos os animais. Durante todo o experimento, foram calculados os índices de conforto térmico adotados como referência, a saber: o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e o Índice de Conforto de Benezra (ICB).

Avaliação de Variáveis Fisiológicas

As variáveis fisiológicas foram mensuradas mensalmente nos turnos da manhã (6h00-9h00) e da tarde (12h00-15h00). A FR foi determinada por observação da região tóraco-abdominal e contagem dos movimentos respiratórios, durante um minuto (mov/min). A FC foi determinada por auscultação, com estetoscópio clínico veterinário, sendo realizada a

contagem dos movimentos cardíacos por minuto (bat/min). Para a aferição da TR, foi utilizado termômetro clínico veterinário, com escala até 44 °C, introduzido no reto do animal e mantido durante dois minutos (°C) (Rosenberger et al. 1993).

Temperaturas de Superfície por Termografia de Infravermelho

Para a aferição da TGO e TSE foi utilizada câmera infravermelha (FLIR Série A320, FLIR Systems, Wilsonville, OR, EUA) (Anexo A). A câmera era fixada a um tripé e era dotada de lente fixa de 25 graus, foco motorizado, escala de temperatura de -20 a 120 °C, sensibilidade térmica de 50mK (<0,05 °C à temperatura ambiente de 30 °C), escala espectral de 7,5 a 13µm e resolução óptica de 320x240 pixels. O índice de emissividade foi previamente ajustado para 0,98 (Hoffmann et al. 2013) e a câmera foi acoplada a um monitor de tela plana de 16 polegadas para visualização das imagens. Imediatamente antes da avaliação, os animais foram contidos em brete, de modo que as distâncias entre a câmera e o globo ocular fosse 1,50 m e para a superfície escrotal fosse de 0,70m.

As TSE mensuradas foram: temperatura do funículo espermático (TFE), temperatura escrotal máxima (TEMax), média (TEMed) e mínima (TEMin), temperatura do polo testicular dorsal (TPTD), temperatura do polo testicular ventral (TPTV) e temperatura da cauda do epidídimo (TCE). Os órgãos bilaterais tiveram suas temperaturas individualmente aferidas, mas em função da ausência de efeito estatístico quanto, os resultados foram apresentados como médias, independentemente do lado avaliado.

Os termogramas foram analisados com o programa Flir Tools + Versão 3.0 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, OR, EUA). Para a obtenção das TEMax, TEMed e TEmIn, foi usado traçado em polígono retangular, compreendendo todo o escroto, do polo ventral ao dorsal dos testículos alcançando o funículo espermático. Para a aferição da TFE, TCE, TPTD e TPTV, foi usado o traçado em polígono retangular sobreposto em cada região definida (Coulter et al. 1997).

Na sequência, foram calculados gradientes térmicos específicos (°C), conforme as equações: gradiente de temperatura retal-funículo espermático ($GTRFE = TR - TFE$), gradiente de temperatura retal-polo dorsal dos testículos ($GTRPD = TR - TPTD$), gradiente de temperatura retal-polo ventral ($GTRPV = TR - TPTV$), gradiente de temperatura retal-cauda do epidídimo

(GTRCE = TR - TCE), gradiente de temperatura retal-escrotal (GTREMed = TR - TEMed) e gradiente de temperatura testicular (GTEST = TPTD - TPTV).

Colheita e Avaliação do Sêmen

A colheita do sêmen foi realizada quinzenalmente pelo método da vagina artificial (Vale 1994) (Anexo A). Foram coletados 16 ejaculados de cada animal, totalizando 176 ejaculados avaliados. Após a colheita, o sêmen foi mantido em banho-maria a 37 °C, para evitar choque térmico e indução de alterações nas características seminais. Imediatamente, o sêmen foi submetido à análise de volume (VOL; mL) em tubo cônico graduado. A concentração espermática (CONC; $\times 10^9/\text{mL}$), foi determinada pela contagem dos espermatozoides em espectrofotômetro, após a diluição do sêmen em solução fisiológica (1:400). A motilidade espermática progressiva (MP; %) foi avaliada em alíquota de 8 μL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37°C), em microscopia de contraste de fase (200X).

Subsequentemente, a morfologia espermática foi avaliada em alíquotas diluídas em solução de formalina tamponada, analisadas em microscopia de contraste de fase (1000X) para determinação da morfologia espermática, adotando-se o critério de classificação em defeitos maiores (DMA; %), defeitos menores (DME; %) e defeitos totais (DT; %) (Bloom 1973). Foram avaliadas 100 células por amostra e o resultado foi expresso em porcentagem (Vale 2002).

Na sequência, foi realizada a avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP; %), através da técnica de eosina-nigrosina, com adição de solução corante e sêmen em partes iguais. Após confecção do esfregaço, a avaliação foi feita em microscopia de campo claro (1000X). Os espermatozoides corados em rosa foram classificados como portadores de membrana plasmática lesada, enquanto aqueles não corados foram considerados como tendo membrana plasmática íntegra (Iqbal et al. 2010).

Monitoramento Climatológico e Determinação dos Índices de Conforto Térmico

A temperatura e a umidade relativa do ar foram registradas a cada 15 minutos por meio de três dataloggers (HOBO® U12-012, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, EUA). Os loggers foram mantidos suspensos a 2,0 metros do solo e estavam distantes 9,0 metros entre

si, protegidos de luz solar direta e água em abrigos meteorológicos (Malama et al. 2013). Os dados registrados foram semanalmente transferidos para software de análise (HOBOWare® Lite 3.1.0, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, EUA), sendo a média dos valores registrados utilizada para o cálculo do Índice de Temperatura e Umidade (ITU). O ITU foi calculado para os turnos da manhã (6h00-9h00) e da tarde (12h00-15h00), segundo a fórmula: $ITU=(0,8TA)+(UR/100)\times[(TA-14,4)+46,4]$, onde TA é a temperatura do ar em termômetro de bulbo seco (°C) e UR é a umidade relativa do ar (%) (Thom 1959). Para a determinação do Índice de Conforto Térmico de Benezra (ICB), foi usada a equação $ICB=TR/38,33+FR/23$, onde TR é a temperatura retal (°C) e FR é a frequência respiratória (mov/min) (Benezra 1954).

Análise Estatística

O tratamento estatístico dos índices de conforto térmico, variáveis fisiológicas, temperaturas de superfície e variáveis seminais contemplou a análise estatística descritiva (média±desvio padrão, valor mínimo e máximo). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do programa estatístico SAS, versão 9.3 (SAS 2011), para verificar o efeito do período (mais chuvoso, de transição e menos chuvoso) e turno do dia (manhã e tarde). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foram realizadas correlações lineares de Pearson, para verificar a magnitude e direção da proporcionalidade das variáveis estudadas.

Resultados

Apesar das médias das variáveis climatológicas durante os períodos estudados terem sofrido certa variação, os índices de conforto calculados (ITU e ICB) não apresentaram diferença significativa entre períodos (Tabela 2). Entretanto, o ITU apresentou diferença entre os turnos da manhã e da tarde.

Tabela 2 Média±desvio padrão dos índices de conforto térmico nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical

Período				
Turno	Mais Chuvoso	Transição	Menos Chuvoso	Média
Índice de Temperatura e Umidade				
Manhã	72.9±0.4 ^B	72.6±1.5 ^B	73.7±0.6 ^B	73.1±1.1
Tarde	79.6±1,9 ^A	79.1±1.3 ^A	79.2±0.8 ^A	79.3±1.3
Média	76.3±3.6	75.9±3.5	76.5±2.8	
Índice de Conforto de Benezra				
Manhã	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1	2.0±0.1
Tarde	2.0±0.1	2.2±0.1	2.2±0.1	2.1±0.1
Média	1.9±0.1	2.1±0.1	2.0±0.2	

Letras maiúsculas, na mesma coluna, e letras minúsculas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A FR apresentou maiores valores no período de transição, sendo que durante o turno da tarde apresentou incremento, principalmente nos períodos de transição e menos chuvoso (Tabela 3). A FC média foi mais elevada no período de transição, tendo sido observado, também, efeito de turno, com maiores valores registrados à tarde. A TR e a TGO não apresentaram diferenças significativas entre os períodos estudados.

Tabela 3 Média±desvio padrão das variáveis fisiológicas nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical

Período				
Turno	Mais Chuvoso	Transição	Menos Chuvoso	Média
Frequência Respiratória				
Manhã	22.2±0.7 ^{Ab}	25.1±0.5 ^{Ba}	22.3±0.5 ^{Bb}	23.2±0.3
Tarde	23.1±0.6 ^{Ac}	29.3±0.5 ^{Aa}	27.5±0.5 ^{Ab}	26.6±0.3
Média	22.6±0.4	27.2±0.3	24.9±0.3	
Frequência Cardíaca				
Manhã	62.7±0.8	64.9±0.6	62.0±0.5	63.2±0.3 ^B
Tarde	63.6±0.7	67.0±0.6	65.7±0.5	65.4±0.3 ^A
Média	63.1±0.5 ^b	65.9±0.4 ^a	63.8±0.4 ^b	
Temperatura Retal				
Manhã	38.1±0.1	37.9±0,1	38.0±0.1	38.0±0.1
Tarde	38.7±0.1	38.4±0.1	38.4±0.1	38.5±0.1
Média	38.4±0.1	38.1±0.1	38.2±0.1	
Temperatura de Globo Ocular				
Manhã	38.1±0.1	38.0±0.1	37.8±0.1	38.0±0.1
Tarde	38.5±0.1	38.4±0.1	38.4±0.1	38.4±0.1
Média	38.3±0.1	38.2±0.1	38.1±0.1	

Letras maiúsculas, na mesma coluna, e letras minúsculas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação às temperaturas específicas registradas nas diferentes regiões da superfície escrotal, foi observada maior TFE no período menos chuvoso (Tabela 4). A TPTD foi mais elevada no período menos chuvoso, com redução no período de transição. Não houve variação da TPTV e da TCE entre os diferentes períodos, nem nos turnos. Os valores de temperatura escrotal (TEMed, TEMin e TEMax) não apresentaram diferença significativa nos diferentes períodos do ano, mas foram sensíveis à mudança de turno.

Tabela 4 Média±desvio padrão das temperaturas de superfície escrotal aferidas por termografia de infravermelho nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical

Período				
Turno	Mais Chuvoso	Transição	Menos Chuvoso	Média
Temperatura do Funículo Espermático				
Manhã	34.2±0.4	34.1±0.2	34.7±0.2	34.3±0.1
Tarde	33.7±0.3	34.3±0.2	34.8±0.2	34.3±0.1
Média	33.8±0.8 ^b	34.2±0.8 ^b	34.7±0.8 ^a	
Temperatura do Polo Testicular Dorsal				
Manhã	34.2±0.2	33.6±0.2	34.2±0.2	34.0±0.1
Tarde	33.7±0.2	33.8±0.2	34.3±0.2	33.9±0.1
Média	33.9±0.9 ^{ab}	33.7±0.8 ^b	34.3±0.7 ^a	
Temperatura do Polo Testicular Ventral				
Manhã	32.2±0.2	32.2±0.2	32.2±0.2	32.2±0.1
Tarde	32.1±0.2	32.4±0.2	32.4±0.2	32.3±0.1
Média	32.2±0.8	32.3±0.8	32.3±0.9	
Temperatura da Cauda do Epidídimo				
Manhã	30.4±0.5	31.2±0.2	31.4±0.2	31.0±0.2

Tarde	30.6±0.3	31.4±0.2	31.3±0.2	31.1±0.1
Média	30.5±0.8	31.3±1.0	31.3±1.0	
Temperatura Escrotal Média				
Manhã	33.0±0.2	32.9±0.1	33.1±0.1	33.0±0.1 ^B
Tarde	33.7±0.2	33.8±0.1	34.3±0.1	34.0±0.1 ^A
Média	33.4±0.1	33.4±0.1	33.7±0.1	
Temperatura Escrotal Mínima				
Manhã	30.3±0.2	29.8±0.1	30.1±0.1	30.1±0.1 ^B
Tarde	31.3±0.2	31.6±0.1	31.8±0.1	31.6±0.1 ^A
Média	30.8±0.1	30.7±0.1	31.0±0.1	
Temperatura Escrotal Máxima				
Manhã	35.3±0.2	35.2±0.2	35.2±0.2	35.3±0.1 ^B
Tarde	35.9±0.2	36.1±0.2	36.6±0.2	36.2±0.1 ^A
Média	35.6±0.1	35.7±0.1	35.9±0.1	

Letras maiúsculas, na mesma coluna, e letras minúsculas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O perfil de temperatura das superfícies das diferentes regiões do escroto, em situação de conforto térmico está ilustrado na Figura 1. Os dados médios indicam a formação de três distintas bandas paralelas, com temperatura decrescente à medida que se afastam da cavidade abdominal. A primeira faixa (banda A) engloba a região do funículo espermático e do polo testicular dorsal, a segunda (banda B) contempla a região medial dos testículos e o polo testicular ventral e a terceira faixa (banda C) contempla a cauda do epidídimo.

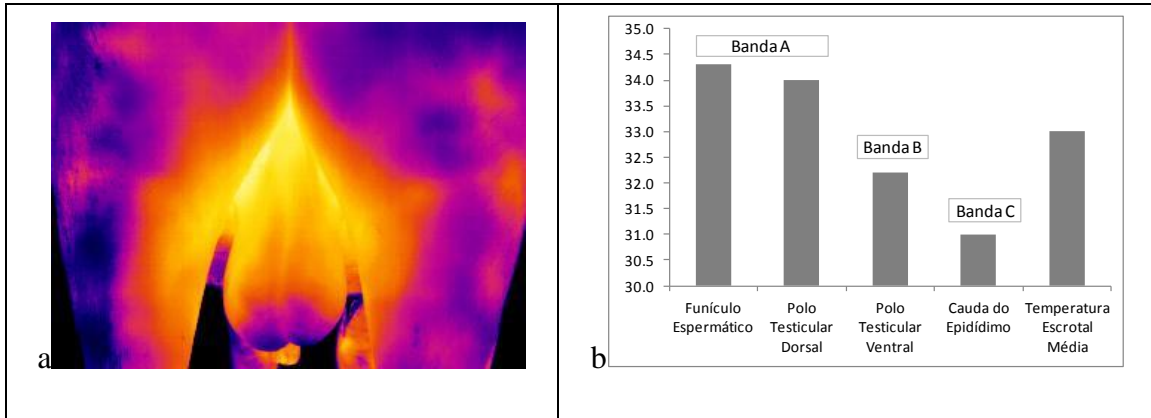


Fig. 1 Imagem termográfica ilustrativa do escroto de touro bubalino em conforto térmico; notar o padrão decrescente de temperatura desde a região do cone vascular à cauda do epidídimo, em três bandas horizontais distintas (a). Gráfico das médias de temperaturas de superfície observadas nas diferentes regiões do escroto de touros bubalinos com termograma normal (b)

Todos os gradientes calculados apresentaram valor maior que zero, independentemente da época do ano e do turno. As menores médias de GTRFE, GTRPD e GTREMed foram observadas no período menos chuvoso, com reduções entre as estações mais e menos chuvosas que variaram de 0,5 a 0,9 °C (Tabela 5). Adicionalmente, o GTREMed sofreu efeito de turno, com ligeira redução de 0,4 °C à tarde. O GTRCE apresentou redução nos períodos de transição e menos chuvoso. O GTEST mostrou-se positivo, com menores valores observados no período de transição e com pequena redução à tarde (0,2 °C).

Tabela 5 Média±desvio padrão dos gradientes de temperaturas de superfície escrotal nos diferentes períodos e turnos de touros búfalos criados em clima tropical

Período				
Turno	Mais Chuvoso	Transição	Menos Chuvoso	Média
Gradiente de Temperatura Retal-Funículo Espermático				
Manhã	4.0±0.3	3.9±0.1	3.4±0.1	3.8±0.1
Tarde	4.5±0.2	3.9±0.1	3.4±0.1	3.9±0.1
Média	4.3±0.7 ^a	3.9±0.7 ^a	3.4±0.6 ^b	

Gradiente de Temperatura Retal-Polo Dorsal				
Manhã	4.2±0.2	4.4±0.1	3.9±0.1	4.2±0.1
Tarde	4.5±0.2	4.4±0.1	3.8±0.1	4.2±0.1
Média	4.4±0.9 ^a	4.4±0.7 ^a	3.9±0.5 ^b	
Gradiente de Temperatura Retal-Polo Ventral				
Manhã	4.9±0.2	4.8±0.2	4.5±0.2	4.7±0.1
Tarde	5.0±0.2	4.7±0.2	4.4±0.1	4.7±0.1
Média	4.9±0.8	4.7±0.8	4.5±0.6	
Gradiente de Temperatura Retal-Cauda do Epidídimo				
Manhã	7.7±0.4	6.8±0.2	6.7±0.2	7.1±0.1
Tarde	7.5±0.3	6.8±0.2	6.9±0.2	7.0±0.1
Média	7.6±0.7 ^a	6.8±0.9 ^b	6.8±0.8 ^b	
Gradiente de Temperatura Retal-Escrotal Média				
Manhã	5.0±0.2	5.0±0.1	4.8±0.1	4.9±0.1 ^A
Tarde	4.9±0.1	4.5±0.1	4.0±0.1	4,5±0,1 ^B
Média	4.9±0.1 ^a	4.7±0.1 ^a	4.4±0.1 ^b	
Gradiente de Temperatura Testicular				
Manhã	2.0±0.1	1.5±0.1	2.0±0.1	1.8±0.1 ^A
Tarde	1.5±0.1	1.3±0.1	1.9±0.1	1.6±0.1 ^B
Média	1.7±0.6 ^{ab}	1.4±0.3 ^b	1.9±0.6 ^a	

Letras maiúsculas, na mesma coluna, e letras minúsculas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os parâmetros seminais estudados não apresentaram alterações entre períodos (Tabela 6), e todas as variáveis apresentaram médias dentro da faixa considerada normal para sêmen *in natura* de bubalinos.

Tabela 6 Média±desvio padrão das variáveis seminais nos diferentes períodos de touros búfalos criados em clima tropical

Variável	Período			CV (%)
	Mais Chuvoso	Transição	Menos Chuvoso	
Volume (mL)	2.2±0.2	2.2±0.1	2.6±0.1	56.7
Concentração (x10 ⁹ sptz/mL)	1.3±0.8	1.3±0.6	1.2±0.6	4.5
Motilidade (%)	67.0±2.1	68.6±1.7	66.7±1.6	4.1
Integridade de Membrana Plasmática (%)	66.5±2.0	68.5±1.6	68.1±1.5	3.6
Defeitos Maiores (%)	14.3±0.9	13.8±0.8	12.2±0.7	11.9
Defeitos Menores (%)	6.7±0.7	5.6±0.6	4.7±0.6	41.5
Defeitos Totais (%)	21.0±1.4	19.5±1.1	17.0±1.1	10.1

Letras iguais nas linhas não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Dentre as correlações calculadas entre variáveis fisiológicas e índices de conforto térmico, foi observado valor positivo e de mesma magnitude do ITU com a TR, TGO e ICB (0,26; P<0,01). Por sua vez, o ICB apresentou correlação significativa com FR (0,89; P<0,01) e FC (0,49; P<0,01). Foi observada correlação significativa e de alta magnitude entre TGO e TR (0,82; P<0,01). A TR apresentou correlação negativa significativa com VOL (-0,22; P<0,01), enquanto a TGO apresentou correlação negativa significativa tanto com VOL (-0,40; P<0,01) quanto com MP (-0,29; P<0,01). Não foram detectadas correlações significativas entre ITU, ICB, FR e FC com as variáveis seminais estudadas.

As correlações das TSE com as variáveis indicativas de conforto térmico e qualidade seminal são apresentadas na Tabela 7. Maior número de correlações significativas foram observadas para TCE e TEMin, (7 correlações), TFE (6 correlações), TEMed (5 correlações) e TEMax (4 correlações).

Tabela 7 Correlação linear entre temperaturas de superfície escrotal e índices de conforto térmico, variáveis fisiológicas e seminais de touros búfalos criados em clima tropical

	Temperatura Funículo Espermático	Temperatura Cauda do Epidídimo	Temperatura Escrotal (Med)	Temperatura Escrotal (Min)	Temperatura Escrotal (Max)
Índice de Temperatura e Umidade	0.26*	0.25*	n.s.	0.42**	n.s.
Índice de Conforto de Benezra	n.s.	0.25*	n.s.	n.s.	n.s.
Temperatura Retal	0.48**	0.52**	0.48**	0.51**	0.41**
Temperatura de Globo Ocular	0.41**	0.65**	0.56**	0.61**	0.46**
Volume Seminal	-0.34*	-0.54**	n.s.	-0.41**	n.s.
Concentração Espermática	0.35**	n.s.	n.s.	n.s.	0.31**
Motilidade Espermática	-0.26*	-0.44**	-0.34**	-0.45**	-0.29**
Integridade de Membrana Plasmática	n.s.	-0.34**	-0.21*	-0.31**	n.s.
Defeitos Espermáticos Maiores	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Defeitos Espermáticos Menores	n.s.	n.s.	n.s.	0.26**	n.s.
Defeitos Espermáticos Totais	n.s.	n.s.	0.11*	n.s.	n.s.

*Significativo a 5%. **Significativo a 1%. n.s. não significativo

A TFE foi influenciada pelo ITU e apresentou correlações de média intensidade (entre 0,30 e 0,60) com TR, TGO, VOL e CONC. O ITU e ICB influenciaram igualmente a TCE, a qual apresentou correlações de média intensidade e positivas com TR e TGO, além de apresentar correlação negativa com VOL, MOT e IMP, estas duas últimas variáveis seminais de extremo interesse andrológico.

As TEMed, TEMin, TEMax, apresentam correlações significativas positivas com TR e a TGO, sendo interessante constatar que a maioria das correlações da TGO tiveram valores superiores às correlações com TR. Dentre essas temperaturas, a única que sofreu efeito de índices de conforto foi a TEMin, a qual foi associada com média intensidade ao ITU. A TEMed apresentou correlação negativa de média intensidade com MOT. A TEMin apresentou correlação negativa de média intensidade com VOL, MOT e IMP, enquanto a TEMax apresentou correlação positiva com CONC. Os defeitos espermáticos foram discretamente influenciados apenas pela TEMed, que se correlacionou positivamente com defeitos totais, e pela TEMin, a qual se correlacionou com defeitos menores.

Discussão

Segundo trabalhos prévios, quando o ITU é ≤ 74 os bubalinos se encontram em condição de conforto térmico. Quando o ITU está entre 75 e 78, a condição passa a ser de alerta. Elevação do ITU para a faixa entre 79 e 83 caracteriza condição de perigo. Quando o ITU é ≥ 84 instala-se condição de emergência, na qual pode haver mortalidade animal se essas condições forem prolongadas e não houver intervenção no manejo dos animais e ou do ambiente (Hahn e Mader 1997; Somparn et al. 2004). O ITU médio observado nos períodos estudados variou de 75,9 a 76,5, indicando que, a princípio, os animais estariam submetidos a uma condição de alerta. Como esperado, o ITU registrado apontou situação de conforto térmico durante as manhãs e maior desafio térmico ao longo da tarde, quando os valores de ITU foram sempre superiores a 79.

Por sua vez, o ICB é um indicador que depende exclusivamente da resposta fisiológica do animal frente ao ambiente térmico. A interpretação do ICB indica que quanto mais próximo de 2,0, mais adaptado o animal seria às condições climáticas tropicais (Benezra 1954). Como o ICB médio variou de 1,9 a 2,1 nos períodos estudados, pode-se pressupor que os touros bubalinos apresentaram alta resiliência ao clima megatérmico local, caracterizado por intensa radiação solar global, temperatura média do ar sempre acima de 26 °C e umidade relativa média nunca menor que 74%. Diferentemente, fêmeas bubalinas apresentam ICB mais

elevado que 2,0 no período menos chuvoso do ano, quando criadas em condições ambientais semelhantes (Garcia et al. 2011).

De fato, a inexistência de diferença na TR dos touros ao longo dos diferentes períodos do ano demonstra que os mesmos não armazenaram calor. Isso corrobora a ideia de que foram eficientes em realizar termólise, mesmo que o ITU tenha se mantido alto durante os períodos mais chuvoso, de transição e menos chuvoso do ano. A elevação da TR em 0,5 °C no turno da tarde não foi significativa ($P>0,05$) e é decorrente do incremento natural observado em função do ritmo circadiano apresentado pelos bubalinos (Silva et al. 2011a; Malama et al. 2013).

O aumento da frequência respiratória, consequente à ofegação, e a elevação da frequência cardíaca são os sinais mais evidentes de ativação da termorregulação nos bubalinos (Gudev et al. 2007; Marai e Haebe 2010). O período de transição, quando ocorre alteração no regime de chuvas, é um momento desafiador para animais criados em clima tropical úmido (Silva et al. 2011b). A FC mais alta no período de transição sugere realmente que este período pode ter sido desafiador para os animais, bem como foram as condições observadas durante as tardes. O aumento na FC surge da necessidade de dissipar calor sob condições quentes e visa elevar a perfusão dos vasos sanguíneos periféricos (Gaughan et al., 2013) para facilitar a perda de calor nas extremidades corpóreas (Haque et al. 2012). Por isso, durante as manhãs, bubalinos criados em regiões tropicais apresentam FC inferior aos valores observados à tarde, independentemente da época do ano (Silva et al. 2011a). Assim, a manutenção da temperatura retal, associada à pequena e natural oscilação da FC e à relativa estabilidade da FR ao longo dos períodos, reflete níveis de ICB próximos ao ideal e, consequentemente, indicam a condição de conforto térmico observada nos touros durante todo o experimento.

Sabe-se que a região do globo ocular é considerada sensível às variações de temperatura ambiente (Thom 1959). Entretanto, não foi observada diferença significativa na TGO nos diferentes períodos estudados, indicando que a variação na temperatura ambiente não foi capaz de alterá-la. Em bovinos criados em região de clima tropical, foram observados valores superiores de TGO no verão e na primavera, época em que as temperaturas do ar são mais elevadas (Menegassi et al. 2015).

A elevação da TFE no período menos chuvoso pode ter sido causada por fatores como maior radiação solar direta e indireta, em decorrência da menor nebulosidade, associada à temperatura ambiente mais elevada (Moraes et al. 2005). O aumento da temperatura ambiente também está ligado à elevação das temperaturas de superfície escrotal de touros bovinos (Berry et al. 2011), e estas refletem diretamente as temperaturas das estruturas intraescrotais

correspondentes (Coulter et al. 1988). Independentemente de turnos, a região do funículo espermático apresentou temperatura superficial média de 34,3 °C. Como a temperatura média do ar variou entre 26,1 e 21,7 °C, haveria uma diferença de temperatura que favoreceria trocas térmicas entre a superfície do ambiente funicular e o ambiente.

A TPTD observada (33,9-34,0 °C) foi superior àquelas registradas para touros bovinos, que oscilam entre 28,5 e 30,4 °C (Kastelic et al. 1995, Kastelic et al. 1996a). Muito provavelmente, a elevação da TPTD no período menos chuvoso teve como origem os mesmos fatores de elevação da temperatura do funículo espermático, bem como a menor possibilidade de perda de calor do sangue por mecanismo de contracorrente durante o trajeto pelo cone vascular (Brito et al. 2012). Em ambiente tropical, maiores valores de TPTD são observados na espécie bovina durante o verão (32,6 °C) e o incremento sazonal na TPTD apresenta correlação negativa com a motilidade espermática (-0,41) (Menegassi et al. 2015). Os resultados demonstram que tanto o funículo espermático quanto o polo testicular dorsal possuem temperaturas mais elevadas que as demais estruturas escrotais devido à maior proximidade da cavidade abdominal. Por isso, foram mais sensíveis às variações climatológicas ao longo do ano.

Diferentemente, relatos prévios indicam que as variações na temperatura ambiente exercem maior efeito sobre o polo testicular ventral (Kastelic et al. 1996a) e a cauda do epidídimo. Estas estruturas anatômicas seriam mais susceptíveis devido à maior exposição ambiental e teriam sua temperatura elevada proporcionalmente ao incremento na temperatura do ar (Menegassi et al. 2015). Esse efeito, porém, não foi observado no presente trabalho, uma vez que a variação da TPTV e da TCE nos períodos e turnos foi insignificante, o que favoreceu a manutenção da qualidade seminal. As TPTV observadas nos touros bubalinos (32,2-32,3 °C) foram aproximadamente 2 graus mais altas do que aquelas registradas em bovinos taurinos (30,2 °C) (Kastelic et al. 1996a) e em bovinos de raça composta (30,3 °C) (Menegassi et al. 2015). A relativa estabilidade da temperatura da cauda do epidídimo observada entre estações (30,5 a 31,3 °C) e turnos pode ser considerada uma característica vantajosa, pois alterações de temperatura epididimária interferem no tempo requerido para a capacitação espermática (Bedford and Yanagimachi 1991).

A redução observada na TPTD em relação à TPTV, que constitui o GTEST, foi de 1,7 °C no período mais chuvoso, 1,4 °C no de transição e 1,9 °C no menos chuvoso. Touros bovinos com termogramas normais apresentam GTEST de 1,6 °C (Kastelic et al. 1995), fato também observado no presente estudo. Por isso, a temperatura nos testículos é maior próxima ao ponto de suprimento arterial e sofre decréscimo a partir do polo testicular dorsal (Kastelic et al.

1996b; Brito et al. 2004b). Além disso, o GTEST se relaciona diretamente com motilidade progressiva e reserva espermática epididimária (Berry et al. 2011), sendo, portanto, de fundamental interesse na avaliação termográfica do escroto. Sabendo-se também que o GTEST é inversamente relacionado à temperatura ambiente (Kastelic et al. 1996a), mais uma vez, pode-se afirmar que os animais se encontravam em situação de conforto térmico e, por isso, não houve interferência na qualidade seminal.

A TEMed observada (33,0 a 34,0 °C) foi superior à observada em touros bovinos (29,8 °C) (Kastelic et al. 1995). Sabe-se que essa temperatura sofre efeito moderado da temperatura ambiente (Kastelic et al. 1996a). A ausência de diferença significativa na TEMed, TEMin e TEMax nos diferentes períodos demonstra que, mesmo com o incremento calórico ambiental, os bubalinos foram capazes de executar termorregulação corpórea e testículo-escrotal de modo eficiente.

A normalidade da função testicular é dependente da manutenção da temperatura escrotal entre 2 a 6 °C abaixo da interna corpórea e comprometimento nessa condição causa vários prejuízos ao parênquima testicular e, conseqüentemente, reduzem a produção de espermatozoides férteis e a qualidade seminal (Garcia et al. 2010; Kastelic 2014). A constatação de menores valores de GTREMed, GTRFE, GTRPD e GTRCE no período menos chuvoso indica que este período foi desafiador aos animais. Contudo, a manutenção da qualidade seminal dentro de parâmetros considerados normais (CBRA 2013) ao longo dos períodos fornece indícios de que os gradientes observados, principalmente o GTREMed (4,5 a 4,9 °C) e o GTRCE (6,8 a 7,6 °C) foram suficientes para manter a normalidade da espermatogênese e da maturação espermática nos touros bubalinos.

A constatação da correlação positiva entre ITU com TR e com TGO demonstra que a temperatura e a umidade relativa do ar podem afetar diretamente a temperatura corpórea dos animais. Resultados semelhantes foram relatados para touros bovinos, os quais apresentaram correlação positiva entre TR e ITU (0,63) (Lunstra e Coulter 1997). Importante ressaltar que animais com correlação ausente ou negativa entre ITU e temperatura corpórea mostram-se mais adaptados ao clima tropical, tornando essa característica passível de interesse em programas de seleção e melhoramento genético (Marcondes et al. 2010).

Por sua vez, a alta correlação entre TGO e TR torna esta primeira variável de grande interesse nos monitoramentos remotos de bubalinos, com perspectivas futuras muito favoráveis para se estimar a temperatura interna corpórea dos animais, sem a necessidade de se realizar contenção física dos animais e dispensando exames invasivos. Com a constatação de alta

correlação alta entre TGO com TCE e TEMin, sugere-se que estas possam ser, mediante estudos complementares mais específicos, indicadores conjuntos sensíveis da qualidade seminal em bubalinos. Isso porque a TCE e a TEMin apresentaram correlações negativas com volume seminal (-0,54 e -0,41), motilidade espermática (-0,44 e -0,45) e integridade de membrana dos espermatozoides (-0,34 e -0,31), características consideradas cruciais para a fertilidade de animais destinados à reprodução. Como esperado, a TEMed apresentou correlação negativa com integridade de membrana espermática e positiva com defeito totais, ratificando que a elevação na temperatura escrotal determina deterioração na qualidade seminal (Berry et al. 2011).

Conclusões

A mensuração das temperaturas de superfície escrotal fornece informações relevantes sobre a condição andrológica de touros bubalinos. Nos diferentes períodos do ano, os touros bubalinos se mantiveram em situação de conforto térmico, mesmo estando submetidos a altos índices de temperatura e umidade do ar. Estando em conforto térmico, os touros não apresentaram comprometimento da termorregulação testículo-escrotal, e sim, termogramas escrotais com gradiente positivo definidos pela presença de três bandas de temperatura decrescentes e qualidade seminal dentro de parâmetros de normalidade para a espécie bubalina.

Adicionalmente, a temperatura do globo ocular se apresentou como uma variável de grande interesse no monitoramento de bubalinos, uma vez que pode ser utilizada para estimar a temperatura interna corpórea, e em conjunto com a temperatura de cauda do epidídimo e a temperatura testicular mínima, poderão ajudar na avaliação da potencial fertilidade dos machos destinados à reprodução.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo apoio financeiro (Projetos PECUS-01100600107 e BIOTEC-01130600105), à Universidade Federal do Pará e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Conformidade com Padrões Éticos

O trabalho foi conduzido de acordo com as orientações da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica.

Referências

Aggarwal A, Singh M (2008) Changes in skin and rectal temperature in lactating buffaloes provided with showers and wallowing during hot-dry season. *Trop Anim Health Prod* 40:223-228.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol Z* 22:711-728.

Bastos TX, Pacheco NA, Nechet D, Sá TDA (2002) Aspectos climáticos de Belém nos últimos cem anos – Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 31p.

Bedford JM, Yanagimachi R (1991) Epididymal storage at abdominal temperature reduces the time required for capacitation of hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 91:403-410.

Benezra MV (1954) A new index measuring the adaptability of cattle to tropical conditions. *J Anim Sci* 13:1015.

Berry DP, Evans RD, Parland, SMC (2011) Evaluation of bull fertility in dairy and beef cattle using cow field data. *Theriogenology* 75:172-181.

Bloom E (1973) The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med* 25:383-391.

Brito LF, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP (2012) Testicular vascular cone development and its association with scrotal temperature, semen quality, and sperm production in beef bulls. *Anim Reprod Sci* 134(3-4):135-140.

Brito LF, Silva AE, Barbosa RT, Kastelic JP (2004b) 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* 61(2-3):511-528.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Belo Horizonte, p.104.

Coulter GH, Cook RB, Kastelic JP (1997) Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. *J Anim Sci* 75:1048-1052.

Coulter GH, Senger PL, Bailey DRC (1988) Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. *J Reprod Fertil* 84:417-423.

Gabaldi SH, Wolf A (2002) A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. *Ciênc Agr Saúde* 2 (2): 66-70.

Garcia AR, Matos LB, Lourenço Junior JB, Nahúm BS, Araújo CV, Santos AX (2011) Variáveis fisiológicas de búfalas leiteiras criadas sob sombreamento em sistemas silvipastoris. *Pesqui Agropecu Bras* 46:1409-1414.

Garcia OS, Vale WG, Garcia AR, Ribeiro HFL, Ferro RS, Rolim Filho ST, Sousa EM (2010) Experimental study of testicular insulation in buffalo. *Rev Vet* 21:889-891.

Gaughan JB, Bonner SL, Loxton I, Mader TL (2013) Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *J Anim Sci* 91:120-129.

Gudev D, Popova-Ralcheva S, Moneva P, Aleksiev Y, Peeva T, Penchev P (2007) Physiological indices in buffaloes exposed to sun. *Arch Zootech* 10:127-133.

Hahn GL, Mader TL (1997) Heat waves in relation to thermoregulation, feeding behavior and mortality of feedlot cattle In: *Proceedings of the 5th International Livestock Environment Symposium Minneapolis, ASAE, St Joseph, Mich*, p.563-567.

Haque N, Ludri A, Hossain SA, Ashutosh M (2012) Comparative studies on temperature threshold for heat shock protein 70 induction in young and adult Murrah buffaloes. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96:920-929.

Hoffmann G, Schmidt M, Ammon C, Rose-Meierhöfer S, Burfeind O, Heuwieser W (2013) Monitoring the body temperature of cows and calves using video recordings from an infrared thermography camera. *Vet Res Commun* 37:91-99.

- Iqbal M, Aleem M, Ijaz A Iqbal M, Aleem M, Ijaz A, Rehman H, Yousaf MS (2010) Assessment of buffalo semen with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay. *J Anim Sci* 88:922-925.
- Kastelic JP (2014) Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology* 81: 18-23.
- Kastelic JP, Brito LF (2012) Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod Dom Anim* 47:45-51.
- Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH, Wallins GL, Entz T (1996a) Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. *Anim Reprod Sci* 41:153-159.
- Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH, Saacke RG (1996b) Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. *Theriogenology* 45(5):935-942.
- Kastelic JP, Coulter GH, Cook RB (1995) Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology* 44:147-152.
- Lunstra DD, Coulter GH (1997) Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. *J Anim Sci* 75:767-774.
- Malama E, Bollwein H, Taitzoglou IA, Theodosiou T, Boscios CM, Kiossis E (2013) Chromatin integrity of ram spermatozoa. Relationships to annual fluctuations of scrotal surface temperature and temperature-humidity index. *Theriogenology* 80:533-41.
- Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM (2008) Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. *Trop Subtrop Agroecosyst* 8:209-234.
- Marai IFM, Haebe AAM (2010) Buffalo's biological functions as affected by heat stress: a review. *Livest Sci* 127:89-109.
- Marcondes CR, Vozzi PA, Cunha BRN, Lôbo RB, Araújo CV, Marques JRF (2010) Variabilidade genética de búfalos em rebanho-núcleo com base na análise de pedigree. *Arq Bras Med Vet Zootec* 62:706-711.
- Menegassi SRO, Barcellos JOJ, Dias EA, Koetz Jr. C, Pereira GR, Peripolli V, McManus C, Canozzi MEA, Lopes FG (2015) Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. *Int J Biometeorol* 59:357-64.
- Moraes BC, Costa JMN, Costa ACL, Costa MH (2005) Variação espacial e temporal da precipitação no estado do Pará. *Acta Amaz* 35:207-214.

- Rosenberger G, Dirksen G, Gründer HD (1993) Exame clínico de bovinos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Santos AX, Kahwage PR, Faturi C, Quinzeiro Neto T, Lourenço Junior JB, Joele MRSP, Garcia AR (2014) Feed supplementation with palm kernel cake-based concentrate increases the quality of water buffalo semen. *Anim Reprod.* 11:85-95.
- SAS - Statistical Analysis System Institute (2011) Base SAS 9.3 Procedures Guide, (Cary, NC: USA).
- Silva JAR, Araújo AA, Lourenço Junior JB, Santos NFA, Garcia AR, Nahúm BS (2011a) Conforto térmico de búfalas em sistema silvipastoril na Amazônia Oriental. *Pesqui Agropecu Bras* 46: 1364-1371.
- Silva JAR, Araújo AA, Lourenço Junior JB, Viana RB, Santos NFA, Garcia AR (2011b) Perfil hematológico de búfalas da raça Murrah, criadas ao sol e à sombra, em clima tropical da Amazônia Oriental. *Acta Amaz* 41:425-429.
- Somporn P, Gibb MJ, Markvichitr K, Chaiyabutr N, Thummabood S, Vajrabukka C (2004) Analysis of climatic risk for cattle and buffalo production in northeast Thailand. *Int J Biometeorol* 49:59-64.
- Thom EC (1959) The discomfort index. *Weatherwise* 12(7): 57-59.
- Vale WG (1994) Collection processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo J* 2:65-81.
- Vale WG (2002) Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: *Proceeding of the 1st Buffalo Symposium of Americas, Belém, PA, (APCB: Belém).* p.156-171.
- Valente MA, Silva J, Rodrigues TE, Carvalho EJM, Rolim PAM, Silva ES, Pereira ICB (2001) Solos e avaliação da aptidão agrícola das terras do Município de Castanhal, Estado do Pará – Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 27p.

5. Artigo 3 - Efeitos da suplementação dietética com lipídeos derivados da indústria do óleo de palma na qualidade do sêmen criopreservado de touros bubalinos

Effects of a diet supplemented with lipids derived of palm oil industry on quality of cryopreserved semen of water buffalo bulls

Artigo a ser submetido ao Periódico *Theriogenology*

Resumo

Alterações nas dietas de touros em centrais de inseminação artificial têm sido estudadas com intuito de contribuir para maior produtividade de sêmen criopreservado. Neste estudo, foi investigado o efeito da suplementação lipídica com óleo de palma bruto (CPO) ou resíduo do refino de palma (PRR) sobre características morfológicas e funcionais do sêmen criopreservado de bubalinos (*Bubalus bubalis*). Os touros foram distribuídos nos grupos controle (CONT; n=4), óleo de palma bruto (CPO; n=4) e resíduo do refino de palma (PRR; n=3). As dietas, adicionadas ou não de 3% de suplemento lipídico, foram administradas durante 120 dias. A cada 15 dias foi realizada a colheita e criopreservação seminal. O sêmen *in natura* foi submetido à avaliação de motilidade progressiva, vigor, viabilidade e defeitos espermáticos. O sêmen criopreservado adicionalmente foi submetido à análise da integridade de membrana plasmática, acrossomo e potencial mitocondrial. A suplementação lipídica não interferiu no consumo de matéria seca. O CPO reduziu defeitos maiores e defeitos totais no sêmen *in natura*. O CPO e PRR elevaram motilidade e viabilidade espermática do sêmen criopreservado ($P<0,05$). A incidência de defeitos maiores no sêmen criopreservado do grupo CPO foi reduzida. Não houve diferença significativa quanto à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto (CONT=40,1 vs CPO=44,2 vs PRR=43,9%; $P>0,05$). O CPO e PRR elevaram porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial ($P<0,05$). Assim, óleo de palma bruto e resíduo do refino de palma podem ser utilizados seguramente na alimentação de touros bubalinos para elevação da qualidade do sêmen criopreservado.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, Óleo de palma bruto; Sêmen congelado; Suplementação lipídica; Ácidos graxos poli-insaturados; Espermatozoide.

Abstract

Changes in the diets of bulls in artificial insemination centers have been studied in order to contribute to increased productivity of cryopreserved sêmen. This study investigated the effect of lipid supplementation Crude Palm Oil (CPO) or Palm Refining Residue (PRR) on morphological and functional characteristics of cryopreserved semen of buffaloes (*Bubalus bubalis*). The bulls were distributed in the control groups (CONT; n=4), crude palm oil (CPO; n=4) and palm refining residue (PRR; n=3). The diets, with or without added 3% of lipid supplement, was administered for 120 days. Every 15 days seminal collection and cryopreservation was performed. The semen *in natura* was submitted to evaluation progressive motility, vigor, viability and sperm defects. The cryopreserved semen additionally was submitted to analysis the plasma membrane integrity, acrosome and mitochondrial potential. Lipid supplementation does not interfere in dry matter intake. The CPO reduced major defects and total defects in semen *in natura*. The CPO and PRR increased sperm motility and viability of sperm cryopreserved ($P<0,05$). The incidence of major defects in semen cryopreserved CPO group was reduced. There was no significant difference in the percentage of sperm with plasma membrane and acrosome intact (CONT=40,1 vs CPO=44,2 vs PRR=43,9%; $P>0,05$). The CPO and PRR increased percentage of sperm with high mitochondrial potential ($P<0,05$). Thus, crude palm oil and palm refining residue can be safely used in the feeding of buffaloes bulls to improve the quality of semen cryopreserved.

Keywords: *Bubalus bubalis*; Crude palm oil; Frozen semen; Lipid supplementation; Polyunsaturated fatty acids; Sperm.

1. Introdução

A qualidade seminal de touros bubalinos pode ser influenciada diretamente por fatores nutricionais [1,2]. Dentre eles, a composição lipídica da dieta tem demonstrado importante efeito nutracêutico, em diferentes espécies animais [3, 4, 5, 6]. Teorias recentes indicam que a composição de lipídeos na dieta pode intervir na proporção de fosfolipídeos das membranas espermáticas, modificando sua fluidez e capacidade fecundante [7, 8]. Por isso, a composição de ácidos graxos dos espermatozoides tem sido considerada determinante para a fertilidade masculina [9].

Os principais ácidos graxos poli-insaturados encontrados nos espermatozoides de touros bubalinos são o ácido linolênico ($\omega 3$) e o ácido linoléico ($\omega 6$), os quais constituem mais de 70% do total dos ácidos insaturados [10]. Estes ácidos são considerados essenciais por não serem sintetizados no organismo animal, e devem ser supridos na dieta [11, 12]. Os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ são convertidos em metabólitos ativos, como o ácido araquidônico, o ácido docosahexaenóico e o ácido eicosapentaenóico, os quais estão envolvidos na fisiologia da membrana espermática [13]. Proporções relativamente elevadas de ácidos graxos poli-insaturados nos espermatozoides podem melhorar os processos de capacitação espermática e reação acrossomal [14, 15].

A criopreservação diminui significativamente a proporção de ácidos graxos poli-insaturados nos espermatozoides [16, 17]. O congelamento dos espermatozoides pode ocasionar danos irreversíveis à membrana plasmática, ao acrossoma e às mitocôndrias [18, 19, 20] e, conseqüentemente, reduzir a qualidade seminal [21]. A integridade da membrana plasmática e do acrossoma são essenciais para que ocorra a fertilização [22, 23]. Em relação às mitocôndrias, qualquer mudança no seu potencial pode refletir na alteração da motilidade espermática [24].

Pesquisas têm sido atualmente realizadas para avaliar óleos ou gorduras vegetais como fontes energéticas alternativas, visando aperfeiçoar seu uso em rações para ruminantes [13, 25, 26, 27]. A inclusão dos resíduos ou coprodutos agroindustriais na alimentação de ruminantes tem ganhado importante papel na produção mundial de carne e leite, pois são fontes de alimentos que não concorrem diretamente com a alimentação humana [28, 29].

Dentre os coprodutos que têm crescido em interesse para a nutrição de ruminantes estão os derivados do processamento da palma de óleo (*Elaeis guineensis*) [30, 31, 32]. Países da faixa intertropical do planeta, como Indonésia, Tailândia, Malásia, Colômbia, Equador, Brasil, Gana e Costa do Marfim, dentre outros, se destacam mundialmente no cultivo agrícola da palma de óleo. Durante a industrialização do fruto da palmeira, o óleo de palma bruto (CPO - *crude palm oil*) é extraído da polpa do fruto, enquanto seu refino físico dá origem ao resíduo do refino (PRR – *palm refining residue*), sendo ambos fontes de ácidos graxos saturados e insaturados [33].

Diante desse contexto, o estudo da incorporação de lipídeos dietéticos advindos de fontes alternativas pode estimular a inclusão de coprodutos agroindustriais na alimentação de touros, principalmente aqueles mantidos em centrais de inseminação artificial. Seu uso pode minimizar os custos de produção e fornecer um aproveitamento econômico e ambiental mais

adequado aos resíduos industriais. Por isso, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da suplementação lipídica com óleo de palma bruto (CPO) ou com resíduo do refino de palma (PRR) sobre as características morfológicas e funcionais do sêmen criopreservado de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*).

2. Material e Métodos

2.1. Local e Período

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), em Castanhal, Pará (1°18'S, 47°56'O). O período experimental compreendeu 120 dias, ocorrendo entre os meses de novembro a fevereiro de 2014.

2.2. Bioética e Animais Experimentais

O ensaio seguiu os preceitos de bioética em experimentação animal e os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais da Embrapa (Declaração CEUA/CPATU 02-2015).

Onze touros bubalinos adultos (50,4±8,6 meses; 673,6±94,0 kg) clinicamente saudáveis e com avaliação andrológica positiva foram usados no experimento. Os animais foram distribuídos em três grupos (CONT - Grupo Controle, n=4; CPO - Óleo de Palma Bruto, n=4; PRR - Resíduo do Refino de Palma, n=3). Para a uniformidade dos grupos, foram considerados idade, condição andrológica e escore de condição corporal dos animais. Os animais foram mantidos em baias individuais sob as mesmas condições ambientais, em regime de coleta de sêmen.

2.3. Delineamento Experimental

Ao início do experimento, os touros tinham seus parâmetros andrológicos conhecidos, com coletas de sêmen realizadas regularmente a cada sete dias. Assim, os touros eram animais reprodutivamente ativos e apresentavam parâmetros seminais dentro da normalidade para a espécie [34]. Os animais receberam as dietas experimentais durante 120 dias, sendo reservados 15 dias para adaptação ao manejo alimentar. Durante o experimento, os animais foram submetidos à colheita e avaliação de sêmen a cada 15 dias (8 ejaculados por touro), totalizando 88 ejaculados criopreservados. No momento da coleta, o sêmen *in natura* foi aliquotado. Uma alíquota foi avaliada quanto à motilidade espermática progressiva (MP; %), vigor (VIG; 1 a 5), viabilidade espermática (VIAB, %), defeitos maiores (DMA; %), defeitos menores (DME; %) e defeitos totais (DT; %). A segunda alíquota foi criopreservada, posteriormente descongelada e avaliada quanto a MP, VIG, DMA, DME e DT, além da análise da integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e de potencial mitocondrial através de citometria de fluxo. A terceira alíquota foi usada para separação do plasma seminal e da fração celular, para extração de lipídeos e análise do perfil lipídico do plasma seminal e da membrana plasmática dos espermatozoides.

2.4. Dietas

As dietas foram formuladas para atender às necessidades de manutenção dos animais [35], sendo elaboradas com silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), concentrado à base de milho e feijão, adicionadas ou não de 3% de suplemento lipídico (CPO ou PRR) (Tabela 1). As três dietas eram isoproteicas. Para a elaboração da silagem, o capim foi cortado com 60 a 65 dias de desenvolvimento, ao atingir uma altura de 1,6 metros. As dietas foram administradas duas vezes ao dia (08h00 e 16h00) em cochos individuais, permitindo 10% de sobras diárias de matéria seca. Diariamente, pela manhã, as sobras do dia anterior foram pesadas, para cálculo do consumo diário individual, considerando a diferença entre matéria seca ofertada e matéria seca restante. Os animais foram individualmente pesados a cada 15 dias, após jejum alimentar de 12 horas. A composição bromatológica das dietas está demonstrada na Tabela 2. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água, mistura mineral e ao cocho de alimentação.

Tabela 1

Composição percentual das dietas experimentais (% da Matéria Seca) oferecidas aos diferentes grupos experimentais.

Dietas*	Grupos**		
	CONT	CPO	PRR
Ingredientes (%) MS			
Milho	23,22	13,86	13,86
Feijão	10,00	10,00	10,00
Óleo de Palma Bruto	-	3,00	-
Resíduo do Refino de Palma	-	-	3,00
Uréia	1,05	1,26	1,26
Silagem de Capim Elefante	65,73	71,88	71,88

* Dietas administradas durante 120 dias.

** CONT: Grupo Controle; CPO: Grupo Óleo de Palma Bruto; PRR: Grupo Resíduo do Refino de Palma.

Tabela 2

Composição química dos concentrados fornecidos aos diferentes grupos experimentais.

Composição (%)	Grupos*		
	CONT	CPO	PRR
Proteína Bruta	20,19	21,15	21,02
Extrato Etéreo	3,69	16,17	15,32
Fibra em Detergente Neutro	25,61	19,52	25,70
Fibra em Detergente Ácido	5,03	3,57	4,56
Matéria Seca	88,21	91,78	89,35

* CONT: Grupo Controle; CPO: Grupo Óleo de Palma Bruto; PRR: Grupo Resíduo do Refino de Palma.

A composição (%) de ácidos graxos dos coprodutos utilizados no experimento encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3

Composição (%) de ácidos graxos dos coprodutos utilizados no experimento.

Ácidos Graxos	Óleo de Palma Bruto (%)	Resíduo do Refino de Palma (%)
Ácido Láurico (C 12:0)	0,19	0,25
Ácido Mirístico (C 14:0)	0,59	0,72
Ácido Palmítico (C 16:0)	37,97	46,05
Ácido Palmitoleico (C 16:1)	0,11	-
Ácido Estearíco (C 18:0)	4,61	4,74
Ácido Oléico (C 18:1)	46,12	39,06
Ácido Linoléico (C 18:2)	9,52	8,37
Ácido Linolenico (C18:3)	0,24	0,22
Ácido Araquídico (C 20:0)	0,33	0,29

2.5. Colheita e Avaliação do Sêmen *In Natura*

O sêmen foi colhido quinzenalmente de cada touro por vagina artificial, à temperatura de 42° a 46 °C [36]. Foram coletados 8 ejaculados de cada animal, totalizando 88 ejaculados avaliados. O sêmen foi imediatamente levado ao laboratório e mantido em banho-maria a 37 °C, para evitar indução de alterações nas características seminais. Imediatamente, o sêmen foi submetido às análises de rotina, quanto a motilidade espermática progressiva (MP; %), vigor (VIG; 1 a 5), viabilidade (VIAB, %), defeitos maiores (DMA; %), defeitos menores (DME; %) e defeitos totais (DT; %).

A MP e o VIG foram avaliados em uma amostra de 8 μL de sêmen depositada sobre lâmina aquecida, recoberta por lamínula, em microscópio de contraste de fase, com aumento de 200X. A avaliação da VIAB foi realizada por coloração supravital de eosina-nigrosina, com adição de sêmen e solução corante em partes iguais de 20 μL . Após confecção do esfregaço, a avaliação diferencial foi feita em 200 células por amostra, em microscopia de campo claro (1000X). Os espermatozoides corados ou parcialmente corados em rosa foram classificados como mortos, e os não corados foram considerados vivos [37]. A morfologia espermática foi avaliada a partir de alíquotas de 40 μL de sêmen diluídas em microtubos contendo 1000 μL de solução de formalina tamponada, analisadas em microscopia de contraste de fase (1000X), sendo avaliadas 100 células por amostra.

2.6 Criopreservação do Sêmen

Para a criopreservação, o sêmen foi inicialmente diluído em TES® [38] para alcançar a concentração final de 40×10^6 espermatozoides/dose. O sêmen foi então envasado em palhetas plásticas de 0,25 mL. O sêmen diluído permaneceu em equilíbrio a 5 °C durante 3 horas. Na sequência, o sêmen foi exposto à curva de congelamento e ao final do processo de criopreservação as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C [36] por no mínimo 30 dias antes de serem analisadas.

2.7. Avaliação do Sêmen Pós-descongelamento e Citometria de Fluxo

O sêmen criopreservado foi descongelado a 35 °C por 30 segundos. Uma amostra por partida foi submetida à avaliação da MP, VIG, VIAB, DMA, DME e DT, conforme os métodos descritos para avaliação do sêmen *in natura*. Adicionalmente, para o sêmen criopreservado, foi realizada a avaliação de integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, de integridade do acrossoma e do potencial mitocondrial, através de citometria de fluxo. A avaliação da integridade da membrana plasmática e do acrossoma foi realizada concomitantemente, com associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (PI; Sigma, 28,707-5) e *Pisum sativum* aglutinina conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC-PSA; Sigma, L-0770), respectivamente. A avaliação do potencial mitocondrial foi realizada mediante uso da sonda 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1,3,3'-Tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1; Sigma, T-4069).

Para a execução da citometria de fluxo, duas palhetas de cada ejaculado foram descongeladas a 35 °C por 30 segundos e seus conteúdos foram agregados em único microtubo. O sêmen descongelado foi separado por gradiente de Percoll e em seguida submetido à lavagem e centrifugação no meio de diluição TALP *sperm* [39]. Posteriormente, uma amostra de 10 µL foi adicionada a 3 µL de PI (2 µg/mL) e 30 µL de FITC-PSA (100 µg/mL). Outra amostra de 10 µL foi adicionada a 3 µL da sonda fluorescente JC-1 (153 µM) [40]. As amostras foram incubadas a 38,5 °C por 10 minutos e posteriormente foram submetidas à avaliação por citometria de fluxo (BD FACSCanto II, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram avaliados 10.000 espermatozoides por amostra. Foram utilizados como controles positivos de análise uma fração das amostras que, após a separação em Percoll, foram incubadas a 4 °C por 30 minutos [41].

2.8. Análise estatística

O tratamento estatístico da suplementação lipídica e da qualidade seminal contemplou a análise estatística descritiva (média±desvio padrão, valor mínimo e máximo). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do programa estatístico SAS, versão 9.3 [42], a fim de verificar o efeito da suplementação lipídica. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5%.

3. Resultados

Os resultados de ingestão das dietas demonstram que a suplementação lipídica não interferiu no consumo diário de matéria seca, em relação ao peso vivo. Não foi observada diferença significativa na ingestão entre os grupos CONT (1,4±0,1%), CPO (1,1±0,2%) e PRR (1,1±0,1%).

A motilidade espermática progressiva do sêmen *in natura* não apresentou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, os tratamentos com CPO e PRR elevaram a motilidade espermática do sêmen criopreservado (Tabela 4). Foi observado que o processo de criopreservação reduziu a motilidade progressiva em todos os grupos. O vigor espermático

não apresentou diferença significativa entre tratamentos, seja para sêmen *in natura*, seja para amostras criopreservadas.

A viabilidade espermática do sêmen *in natura* não foi distinta entre grupos ($P>0,05$). Porém, houve efeito positivo e significativo para o sêmen criopreservado, com valores superiores para os grupos CPO e PRR. Os animais do grupo CPO apresentaram menor porcentagem de defeitos espermáticos maiores quando comparados aos animais dos grupos CONT e PRR, tanto no sêmen *in natura* quanto no criopreservado. Não houve diferença significativa entre grupos quanto à porcentagem de defeitos espermáticos menores, tanto no sêmen *in natura* quanto no criopreservado. No entanto, o tratamento com CPO reduziu a porcentagem de defeitos totais no sêmen *in natura*.

Tabela 4

Média±desvio padrão do sêmen *in natura* e criopreservado de touros bubalinos nos diferentes grupos.

Variável	Grupos			
	Controle	Óleo de Palma Bruto	Resíduo do Refino de Palma	CV (%)
Motilidade Progressiva (%)				
Sêmen <i>in natura</i>	70.5±1.2 ^A	72.7±1.4 ^A	70.7±1.2 ^A	7.4
Sêmen Criopreservado	60.2±1.2 ^{Bb}	67.9±1.4 ^{Ba}	65.2±1.3 ^{Ba}	12.1
Vigor Espermático (%)				
Sêmen <i>in natura</i>	3.2±0.1 ^A	3.2±0.1	3.2±0.1	0.5
Sêmen Criopreservado	2.5±0.1 ^B	3.3±0.1	2.9±0.1	20.0
Viabilidade (%)				
Sêmen <i>in natura</i>	70.9±1.4	72.8±1.7	69.2±1.4	10.7
Sêmen Criopreservado	61.1±1.3 ^b	69.4±1.5 ^a	67.8±1.3 ^a	9.2

Defeitos Maiores (%)				
Sêmen <i>in natura</i>	12.2±0.8 ^a	9.3±1.0 ^b	13.2±0.8 ^a	6.0
Sêmen Criopreservado	12.4±0.8 ^a	9.4±1.0 ^b	11.2±0.8 ^{ab}	46.0
Defeitos Menores (%)				
Sêmen <i>in natura</i>	3.7±0.5	3.0±0.5	2.7±0.5	3.5
Sêmen Criopreservado	3.3±0.5	3.5±0.5	2.7±0.5	85.0
Defeitos Totais (%)				
Sêmen <i>in natura</i>	16.0±1.0 ^a	12.3±1.2 ^b	16.0±1.0 ^a	7.3
Sêmen Criopreservado	15.8±1.0	12.9±1.2	14.0±1.0	41.1

Letras maiúsculas, na mesma coluna, e letras minúsculas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A avaliação do sêmen criopreservado com marcadores fluorescentes por citometria de fluxo está demonstrada na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre grupos quanto à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto (PI-/PSA-). Ausência de efeito também foi notada para as células classificadas como PI+/PSA+ e PI-/PSA+. Diferença significativa foi observada para os grupos CPO e PRR quanto à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomo intacto (PI+/PSA-). Contudo, os tratamentos CPO e PRR elevaram a porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

Tabela 5

Média±desvio padrão das características avaliadas por citometria de fluxo no sêmen criopreservado de touros bubalinos nos diferentes grupos.

Variável	Grupos		
	Controle	Óleo de Palma Bruto	Resíduo do Refino de Palma
Integridade de membrana plasmática e acrossomal			
PI-/PSA- (%)	40.1±2.3	44.2±2.8	43.9±2.4
PI+/PSA+ (%)	21.8±1.5	20.4±1.8	20.1±1.5
PI+/PSA- (%)	13.9±1.4 ^{ab}	17.2±1.7 ^a	12.2±1.4 ^b
PI-/PSA+ (%)	23.9±2.0	17.9±2.4	23.5±2.1
Potencial mitocondrial			
JC1 Alto (%)	25.6±1.6 ^b	31.5±1.9 ^a	32.0±1.6 ^a
JC1 Médio (%)	35.0±2.1 ^a	24.3±2.5 ^b	26.9±2.1 ^b
JC1 Baixo (%)	39.3±2.2	43.3±2.6	40.2±2.3

Letras iguais nas linhas não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. Discussão

A suplementação de ruminantes com lipídeos pode reduzir o consumo de matéria seca [43], pois o aumento gradativo na proporção de lipídios dietéticos determina redução linear no consumo diário de matéria seca [44]. A inclusão lipídica acima de 5% da matéria seca reduz o consumo, devido à ação de mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos ou em função da limitada capacidade dos ruminantes em oxidar ácidos graxos [45]. A adição de lipídeos a 3% da matéria seca total na dieta, com óleo de palma bruto ou o resíduo graxo do refino, não afetou negativamente o consumo de touros bubalinos. Provavelmente, o nível de utilização dos lipídios esteve abaixo da concentração capaz de desencadear redução no consumo.

Em suínos, a criopreservação causa redução na concentração de ácidos graxos poli-insaturados e de colesterol na membrana plasmática, ocasionando o aumento no nível de espermatozoides com reação acrossomal e diminuição da motilidade espermática [21]. Como esperado, a criopreservação causou redução da motilidade espermática em todos os grupos observados. Contudo, a motilidade espermática superior observada nos animais pertencentes aos grupos CPO e PRR após a criopreservação sugere possível incorporação de ácidos graxos poli-insaturados pela membrana plasmática dos espermatozoides. De fato, segundo trabalhos prévios, a suplementação de ruminantes com ácidos graxos poli-insaturados modifica a composição lipídica da membrana espermática [3, 16, 31], alterando sua fluidez, estabilidade, permeabilidade e integridade. Ganhos adicionais foram previamente registrados para a motilidade, viabilidade e capacitação espermática [46, 47].

A suplementação dietética de reprodutores ovinos com óleo de peixe e vitamina C elevou a motilidade progressiva espermática [48]. O uso de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente em dietas ricas em ácido linolênico, na alimentação de bovinos também promoveu elevação da motilidade espermática tanto no sêmen *in natura* quanto após a criopreservação [13]. O enriquecimento dietético com ácido docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico resultou em aumento da motilidade espermática no sêmen *in natura*, mas não a incrementou no sêmen criopreservado [49]. Além disso, a adição de ácidos graxos poli-insaturados dietéticos também eleva os níveis de lipídeos circulantes e colesterol, o qual é precursor dos hormônios esteroides, importantes para maturação sexual e espermatogênese [50, 51].

No presente estudo, não foi observada diferença significativa no vigor espermático entre os grupos. Entretanto, em trabalho recente com touros bubalinos, constatou-se que a adição de óleo de palma na dieta apresentou efeito positivo na cinética espermática, com elevação na habilidade de progressão dos espermatozoides, a partir da segunda espermatogênese sob efeito da suplementação, ou seja, em torno de 90 dias após o seu início [30]. Deste modo, para a avaliação da influência da suplementação alimentar em touros bubalinos, deve ser considerado o tempo necessário para que ocorra a espermatogênese e o tempo de armazenamento epididimário, sendo em média de 38,7 dias e 9,3 dias, respectivamente [52].

Os valores superiores observados para viabilidade espermática no sêmen criopreservado reforçam a importância da suplementação lipídica para touros bubalinos. Esses dados reforçam os resultados observados em bovinos e a tese de que a adição dietética de

ácidos graxos poli-insaturados é capaz de elevar a porcentagem de células viáveis no sêmen *in natura* e criopreservado [27].

Apesar do relato prévio de que o uso de concentrados ricos em óleos vegetais não ocasiona melhoria na morfologia espermática de touros bubalinos [31], constatou-se efeito benéfico no presente estudo. A suplementação com óleo de palma bruto foi favorável, com redução de células com defeitos espermáticos maiores e totais nos ejaculados dos animais, sugerindo que a adição de lipídeos dietéticos influencia positivamente a morfologia espermática. Igualmente, a adição de ácidos graxos poli-insaturados e vitamina C na dieta de carneiros aumentou a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais [48].

Há relatos de que a suplementação de touros bubalinos com concentrados a base de farelo de coco ou torta de amêndoa de dendê eleva a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra [31]. A adição de óleo ou semente de girassol a 1% da matéria seca total da dieta também eleva a integridade da membrana plasmática do sêmen criopreservado de bubalinos [1]. Entretanto, no presente estudo, a ausência de diferença significativa entre os grupos quanto à categoria de células com membrana plasmática e acrossoma íntegros (PI-/PSA-) demonstra que a porcentagem lipídica de 3% adicionada às dietas não foi suficiente para alterar esses parâmetros.

Por outro lado, a diferença observada entre os grupos CPO e PRR em relação à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomo intacto (PI+/PSA-) poderia ser relacionada ao processo de lipoperoxidação da membrana plasmática. O aumento da concentração de lipídios insaturados na membrana plasmática dos espermatozoides pode transformá-los em potenciais alvos para a lipoperoxidação [53], causando danos irreversíveis à membrana [54]. Entretanto, em garanhões, a suplementação com óleo de linhaça e antioxidante não influenciou a integridade da membrana plasmática do sêmen criopreservado [55]. Em contrapartida, estudos em carneiros demonstraram aumento da integridade da membrana plasmática e acrossoma com a suplementação com óleo de peixe e vitamina C [48].

Todavia, como os animais do grupo CPO apresentaram sêmen com maior motilidade espermática progressiva, maior viabilidade celular e menor porcentagem de defeitos maiores e totais, pode-se anular a possibilidade de lipoperoxidação na membrana plasmática, e sugerir que a criopreservação possa ter causado um decréscimo na proporção de PUFAS na membrana plasmática. Sabe-se que o processo de congelamento e descongelamento tem sido

relacionado à redução de PUFAS, especialmente o ácido docosahexaenóico [16], o que pode afetar a integridade da membrana plasmática espermática.

A observação de que animais dos grupos CPO e PRR apresentaram maior porcentagem de células com alto potencial mitocondrial sugere que a suplementação lipídica melhora a função mitocondrial. Considerando que os animais tratados com óleo de palma bruto e resíduo graxo do refino de palma também apresentaram maior motilidade espermática após a criopreservação, pode-se afirmar que estes eventos realmente estejam interligados. As mitocôndrias relacionam-se com a produção de energia [56, 57] e, em virtude disso, qualquer mudança no potencial mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade espermática [58, 59].

Assim, considera-se que tanto os tratamentos com óleo de palma bruto quanto com resíduo graxo do refino de palma apresentaram efeitos favoráveis ao sêmen criopreservado, quando comparados ao arrazoamento convencional de touros bubalinos. Considerando conjuntamente a elevação da motilidade e da viabilidade espermática, a redução da incidência de defeitos morfológicos e a elevação no número de células com alto potencial mitocondrial, o tratamento com óleo de palma bruto parece ter apresentado efeito ainda superior. Contudo, ambas suplementações poderiam ser indicadas para elevar a qualidade do sêmen criopreservado de touros bubalinos.

5. Conclusões

A suplementação dietética de touros bubalinos com concentrados enriquecidos com óleo de palma bruto ou com resíduo graxo do refino de palma elevou importantes parâmetros seminais, como motilidade, viabilidade espermática, normalidade morfológica e potencial mitocondrial, os quais estão diretamente relacionados com a capacidade de fertilização do sêmen. Portanto, esses coprodutos agroindustriais podem ser utilizados com segurança na alimentação de touros bubalinos em centrais de inseminação artificial, com expectativa positiva de elevação na qualidade do sêmen criopreservado.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo apoio financeiro (Projetos PECUS-01100600107 e BIOTEC-01130600105), à Universidade Federal do Pará e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Referências

- [1] Adeel M, Ijaz A, Aleem M, Rehman H, Yousaf MS, Jabbar MA. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Theriogenology* 2009; 71:1220-5.
- [2] Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, van der Spek PJ, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod (Oxford, England)* 2009; 24:1304-12.
- [3] Blesbois E, Douard V, Germain M, Boniface P. Effect of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology* 2004; 61:537-49.
- [4] Mitre R, Cheminade C, Allaume P, Legrand P, Legrand AB. Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. *Theriogenology* 2004; 62:1557-66.
- [5] Stoffel W, Holz B, Jenke B, Binczek E, Gunter RH, Kiss C, Karakesisoglou I, Thevis M, Weber AA, Arnhold S et al. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *Embo J* 2008; 27:2281-92.
- [6] Roqueta-Rivera M, Stroud CK, Haschek WM, Akare SJ, Segre M, Brush RS, Agbaga MP, Anderson RE, Hess RA, Nakamura MT. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J Lipid Res* 2010; 51:360-67.
- [7] Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM, Hermier D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod* 1997; 56:1216-20.

- [8] Pustowka C, McNiven MA, Richardson GF, Lall SP. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquat Res* 2000; 31:297-305.
- [9] Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutr* 2010; 29:100-5.
- [10] Jain YC, Anand SR. Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminal plasma and sperm lipid. *J Soc Reprod Fertil* 1976; 47:261-7.
- [11] Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging* 2002; 23:843-853.
- [12] Perini JAL, Stevanato FB, Sargi SC, Visentainer JEL, Dalalio MMO, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev Nutr* 2010; 23:1075-86.
- [13] Moallem U, Neta N, Zeron Y, Zachut M, Roth Z. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2015; 83:1110-20.
- [14] Lenzi A, Gandini L, Picardo M, Tramer F, Sandri G, Panfili E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Front Biosci* 2000; 5:1-15.
- [15] Furland NE, Oresti GM, Antollini SS, Venturino A, Maldonado EN, Avelldano MI. Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem* 2007; 282:18151-61.
- [16] Cerolini S, Zaniboni L, Maldjian A, Gliozzi T. Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology* 2006; 66:877-86.
- [17] Ejaz R, Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Husna AU, Iqbal R, Akhter S. Arachidic Acid in Extender Improves Post-thaw Parameters of Cryopreserved Nili-Ravi Buffalo Bull Semen. *Reprod Dom Anim* 2014; 49:122-25.

- [18] Melville DF, Johnston SD, Miller RR Jr. Flying-fox (*Pteropus* spp.) sperm membrane fatty acid composition, its relationship to cold shock injury and implications for cryopreservation success. *Cryobiology* 2012; 65:224-9.
- [19] Minervini F, Guastamacchia R, Pizzi F, Dell'Aquila ME, Barile VL. Assessment of Different Functional Parameters of Frozen–Thawed Buffalo Spermatozoa by Using Cytofluorimetric Determinations. *Reprod Dom Anim* 2013; 48:317-24.
- [20] Kumar D, Kumar P, Singh P, Yadav SP, Sarkar SK, Bharadwaj A, Yadav PS. Characteristics of frozen-thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls. *Indian J Anim Sci* 2014; 84:389-92.
- [21] Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noblea R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 2005; 63:411-21.
- [22] Pena FJ, Rodriguez Martinez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Macias Garcia B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 345-49.
- [23] Arruda RP, Orro IR, Passos TS, Costa Silva EV, Zúccari CESN. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. *Rev Bras Reprod Anim* 2010; 34:168-84.
- [24] Rodriguez-Martinez H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Anais... Goiânia-GO, p.16, 2005.
- [25] Esmaili V, Shahverdi AH, Alizadeh AR, Alipour H, Chehrazhi M. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. *Andrologia* 2014; 46:42-49.
- [26] Gürler H, Calisici O, Calisici D, Bollwein H. Clinic Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidant capacity of bovine seminal plasma. *Anim Reprod Sci* 2015; 160:97-104.
- [27] Khoshvaght A, Towhidi Armin, Zare-Shahneh A, Noroozi M, Zhandi M, Davachi ND, Karimi R. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology* 2016; 85: 807-12.

- [28] Bringel LML. Avaliação nutricional da torta de dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq) em substituição à silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) na alimentação de ruminantes. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins, 2009.
- [29] Tyagi AK, Tran LV, Malla BA, Kumar S. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction: A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016; doi: 10.5713/ajas.15.1034.
- [30] Gonçalves AA, Garcia AR, Arruda RP, Barioni Junior W, Lourenço Junior JB, Kahwage PR, Silva GR. A suplementação alimentar com ácidos graxos insaturados melhora a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*) pós descongelação. *Semina: Ciências Agrárias* 2014; 35:2467-84.
- [31] Santos AX, Kahwage, PR, Faturi C, Quinzeiro TN, Lourenço Junior JB, Joele MRSP, Garcia, AR. Feed supplementation with palm kernel cake-based concentrate increases the quality of water buffalo semen. *Anim. Reprod* 2014; 11:85-95.
- [32] Silva GR, Garcia AR, Faturi C, Lourenço Junior JB, Nahúm BS, Gonçalves AA, Kawhage PR, Silva LHM, Meneses AMC. Adição de óleo de palma na dieta sobre a lipídemia e a qualidade do sêmen de bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Arqu Bras Med Vet Zootec* 2014; 66:152-160.
- [33] Grupo Agropalma. Óleo de Palma Bruto e Ácido Graxo de Palma. Ficha Técnica de Produto, folha1/1, 2010.
- [34] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104 p. [35] Paul SS, Lal D. Nutrient requirements of buffaloes. India: SSPH, 2010.137p.
- [36] Vale WG. Collection processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo J* 1994; 2:65-81.
- [37] Iqbal M, Aleem M, Ijaz A, Rehman H, Yousaf MS. Assessment of buffalo semen with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay. *J Anim Sci* 2010; 88:922-25.
- [38] Vale WG, Ohashi OM, Ribeiro HFL, Sousa JS. Semen freezing and artificial insemination in the water buffalo in the Amazon valley. *Buffalo Journal* 1991; 7:137-44.
- [39] Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 1983; 28: 235-43.

- [40] Celeghini, ECC, Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Arruda RP. Avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides de carneiros por sondas fluorescentes *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010; 62:536-43.
- [41] Santana PPB, Silva BB, Silva TVG, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, Ohashi OM, Miranda MS. Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. *Theriogenology* 2016; 85:1132-38.
- [42] SAS - Statistical Analysis System Institute, 2011. Base SAS 9.3 Procedures Guide, (Cary, NC: USA).
- [43] Berchielli TT, Messana JD, Canesin RC. Produção de metano entérico em pastagens Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 1959; 37.
- [44] Costa QPB, Wechsler FS, Costa DPB, Polizel Neto A, Roça RO, Brito TP. Desempenho e características da carcaça de bovinos alimentados com dietas com caroço de algodão. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2011; 63:729-35.
- [45] Palmquist DL, Mattos WRS. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T. et al. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p.287-310.
- [46] Stillwell W, Stephen RW. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 2003; 126:1-27.
- [47] Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Mitchell LM, Mcevoy TG. Nutrition and fertility in ruminant livestock animal. *Feed Sci Technol* 2006; 126:259-76.
- [48] Jafaroghli M, Abdi-Benemarb H, Zamiric MJ, Khalilid B, Farshade A, Shadparvar AA. Effects of dietary n – 3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and bloodmetabolites in fat-tailed. *Anim Reprod Sci* 2014; 147:17-24.
- [49] Gholami H, Chamani M, Towhidi A, Fazeli MH. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology* 2010; 74:1548-58.
- [50] Manjunath P, Therien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immun* 2002; 53:109-19.

- [51] Van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11:583-90.
- [52] França LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63:300-18.
- [53] Brouwers JFHM, Gadella BM. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Biol Med* 2003; 35:1382-91.
- [54] Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revi Bras Reprod Anim* 2009; 33:183-93.
- [55] Yvonne S-L, Aurich C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology* 2014; 81:966-73.
- [56] Flesh FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469:197-235.
- [57] Garner DL, Hafez ESE. Espermatozóides e plasma seminal. In: Hafez ESSE, Hafez B., editores. *Reprodução Animal*, Barueri: Manole; 2004, p. 97-110.
- [58] Januskauskas A, Zilinskas H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Vet Zootec* 2002; 17:1-8.
- [59] Celeghini ECC, Nascimento J, Andrade AFC, Raphael CF, Souza LWO, Rodrigues PHM, Arruda RP. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. *Acta Sci Vet Supl* 2005; 33: 327.

6 CONCLUSÃO GERAL

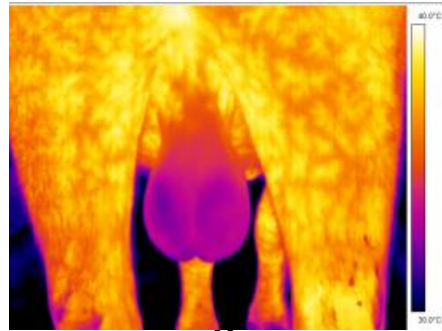
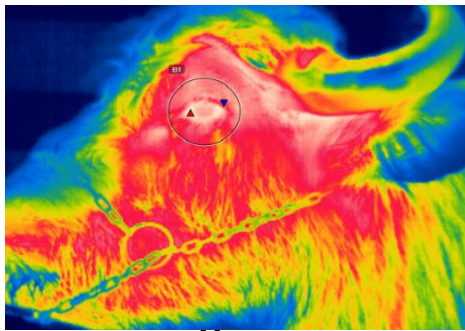
A qualidade seminal de touros bubalinos sofre influência direta de fatores ambientais e nutricionais e, mesmo que os búfalos apresentem capacidade de adaptação a diversas condições, são necessárias medidas de manejo que proporcionem conforto térmico e suprimento de suas exigências nutricionais.

Como durante todos os períodos do ano os bubalinos foram mantidos em situação de conforto térmico, estes apresentaram termogramas escrotais com gradiente positivo,

normalidade no mecanismo da termorregulação testículo-escrotal e qualidade seminal adequada para a espécie.

A suplementação lipídica com óleo de palma bruto e resíduo graxo do refino de palma, coprodutos agroindustriais disponíveis na Região Amazônica, apresenta efeito positivo e melhora os parâmetros seminais relacionados diretamente com a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Portanto, esses coprodutos podem ser utilizados com segurança na alimentação de touros bubalinos em centrais de inseminação artificial, visando melhorar a qualidade do sêmen criopreservado produzido.

ANEXO A



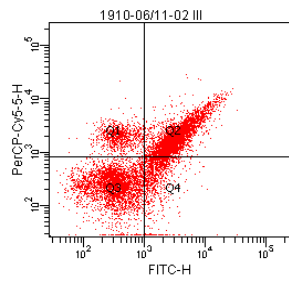
Legenda: A e B - Animais experimentais; C - Colheita do sêmen pelo método da vagina artificial; D - Dataloggers para registro de temperatura e a umidade relativa do ar; E e F - Captura de imagens termográficas de globo ocular e de superfície escrotal; G e H - Imagens termográficas de globo ocular e de superfície escrotal.

ANEXO B

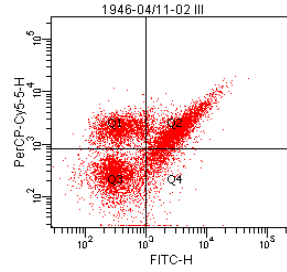


Legenda: **A** - Animais experimentais em baias individuais; **B** - Dietas administradas em cochos individuais; **C** - Silagem adicionada ao concentrado experimental; **D**, **E** e **F** - Concentrados administrados aos grupos Controle, Óleo de Palma Bruto e Resíduo Graxo do Refino de Palma, respectivamente.

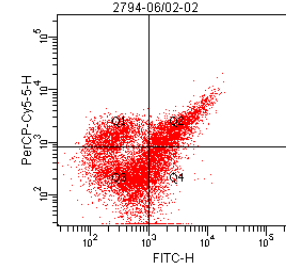
ANEXO C



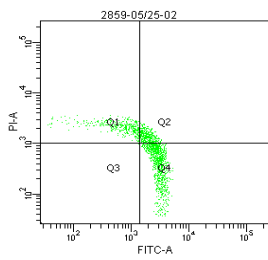
A



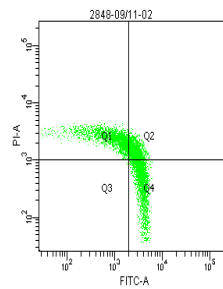
B



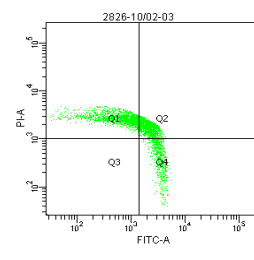
C



D



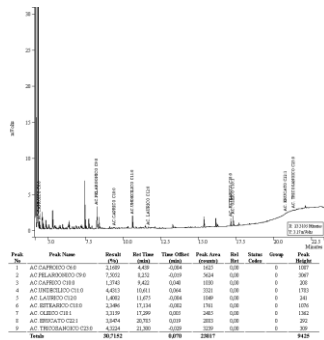
E



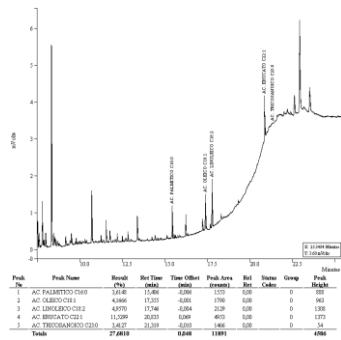
F

Legenda: A, B e C – Gráficos de dot-plots da avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossoma nos grupos Controle, Óleo de Palma Bruto e Resíduo Graxo do Refino de Palma, respectivamente; D, E e F - Gráficos de dot-plots da avaliação do potencial mitocondrial nos grupos Controle, Óleo de Palma Bruto e Resíduo Graxo do Refino de Palma, respectivamente.

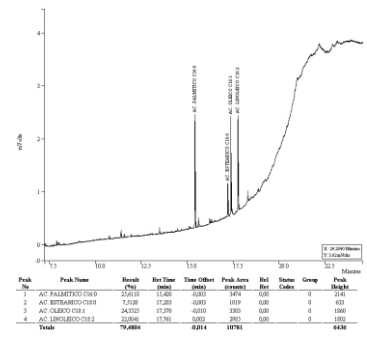
ANEXO D



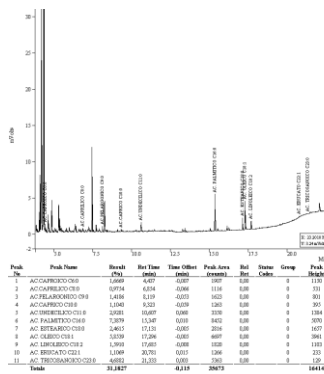
A



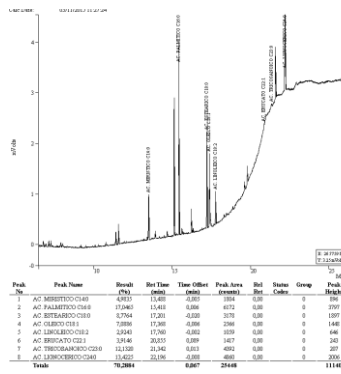
B



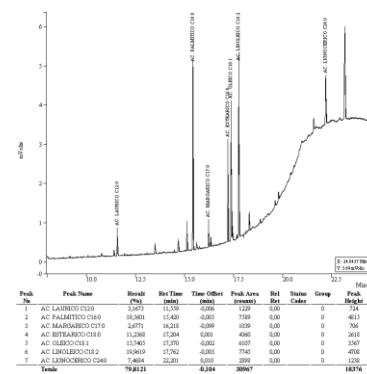
C



D



E



F

Legenda: A, B e C - Avaliação do perfil lipídico do plasma seminal nos grupos Controle, Óleo de Palma Bruto e Resíduo Graxo do Refino de Palma, respectivamente; D, E e F - Avaliação do perfil lipídico da membrana plasmática dos espermatozoides nos grupos Controle, Óleo de Palma Bruto e Resíduo Graxo do Refino de Palma, respectivamente.