

Guilherme de Oliveira Andrade

**AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS SEXUAIS DE
TOUROS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) CRIADOS EM CLIMA SUBTROPICAL
ÚMIDO (19° LATITUDE SUL)**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Reprodução animal

Orientador: Prof. Dr. Marc Henry

**UFMG – Escola de Veterinária
Belo Horizonte
2016**

A553a Andrade, Guilherme de Oliveira, 1990-
Avaliação da sazonalidade nas características sexuais de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) criados em clima subtropical úmido (19° latitude sul) / Guilherme de Oliveira Andrade. – 2016.
68 p. : il.

Orientador: Marc Henry

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Búfalo – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Teses. 3. Comportamento sexual dos animais – Teses. 4. Sazonalidade. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.293 089 26

FOLHA DE APROVAÇÃO

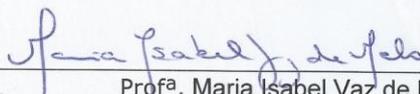
GUILHERME DE OLIVEIRA ANDRADE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

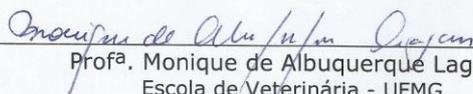
Aprovada em 29 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Presidente - Orientador



Profª. Maria Isabel Vaz de Melo
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC -MG



Profª. Monique de Albuquerque Lagares
Escola de Veterinária - UFMG

Quando as pessoas são determinadas, podem superar qualquer coisa
(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo exemplo, afeto e ensinamentos passados em minha vida.

Ao meu pai, por todo apoio.

Aos meus irmãos, Gustavo e Fabiana, pelo incentivo e companheirismo.

À minha namorada e melhor amiga, Amanda, pelo amor, carinho, companheirismo, conselhos e risadas.

À minha vó Marilu, meu tio Papu e sua mulher Rose pelas brincadeiras e auxílio sempre que necessário.

Ao meu orientador Prof. Marc Henry, por todos os ensinamentos pessoais e profissionais e valores passados.

Ao funcionário e amigo Marcelino, pessoa sensacional, sem ele não teria como realizar nenhum experimento com os búfalos

À Bia, pelos 8 anos me aguentando, companheira desde o primeiro período da faculdade.

Aos amigos de pós-graduação Mayara, Paty, Jaci, Verônica pelos momentos de diversão, trabalho e por toda a ajuda na realização do experimento.

Aos alunos Pacote e Marcus pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos Dharlan, Cesinha, Escamoso, Maldonado, Byron, Corujão, Portuga, Xester, Roli, Brunin, Paiva por toda a torcida.

Aos colegas de faculdade Ana Flávia, Fernanda, Macaco, Pira, Zezin, Ana Cláudia e Ratão por tornarem todo o percurso mais agradável.

Aos professores da reprodução Alan, Vicente, Monique, Marcelo e Pinho por todos os ensinamentos passados.

Ao Danilo Bastos, pelo auxílio com a estatística do experimento.

Às instituições de fomento CNPQ, CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a realização do experimento.

SUMÁRIO

RESUMO	9
1- INTRODUÇÃO	11
2- OBJETIVOS	12
3- REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 SAZONALIDADE REPRODUTIVA.....	12
3.1.1 NUTRIÇÃO	13
3.1.2 CLIMA.....	13
3.1.3 FOTOPERÍODO.....	15
3.1.3.1 MELATONINA.....	15
3.2 A SAZONALIDADE REPRODUTIVA DA FÊMEA BUBALINA.....	17
3.3 A SAZONALIDADE REPRODUTIVA DO MACHO BUBALINO.....	18
3.3.1 QUALIDADE SEMINAL.....	18
3.3.2 COMPORTAMENTO SEXUAL.....	21
3.3.3 OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO.....	21
3.4 ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO DOS BÚFALOS.....	22
4- MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	23
4.2 ANIMAIS UTILIZADOS.....	23
4.3 COLETA DE SÊMEN.....	24
4.4 DADOS CLIMÁTICOS.....	25
4.5 ESPERMOGRAMA.....	25
4.6 COMPORTAMENTO SEXUAL.....	26
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 DADOS CLIMÁTICOS.....	26
5.2 ANÁLISE DO SÊMEN.....	28
5.2.1 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE NA QUALIDADE SEMINAL.....	30
5.3 COMPORTAMENTO SEXUAL.....	36
5.3.1 COLETAS DE SÊMEN.....	36

5.3.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL.....	37
6- CONCLUSÕES.....	40
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características seminais de touros bubalinos coletados através de vagina artificial, de acordo com a estação, em diferentes trabalhos publicados de 1971 a 2015	19
Tabela 2- Parâmetros espermáticos do ejaculado de touros bubalinos coletados através de vagina artificial referidos por Vale et al. (2008) e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013)	23
Tabela 3- Médias bimestrais dos dados climáticos do período de 12 meses dos anos de 2014 e 2015 na latitude 19° 88' sul e longitude 43° 97' oeste.....	27
Tabela 4- Médias bimestrais do índice de temperatura e umidade (ITH) na latitude 19° 88' sul e longitude 43° 97' oeste no período de 12 meses do experimento nos anos de 2014 e 2015.....	28
Tabela 5- Distribuição dos ejaculados (coletas com sucesso/tentativas realizadas) de acordo com os meses do ano.....	28
Tabela 6- Valores médios anuais das características seminais de búfalos coletados semanalmente durante um ano.....	29
Tabela 7- Média bimestral da porcentagem dos defeitos de cada porção do espermatozoide.....	36
Tabela 8- Média \pm desvio padrão dos tempos de reação (s) e média das proporções dos comportamentos sexuais (%) de cada animal durante todo o período estudado.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da via retino-hipotalâmica de síntese de melatonina (Adaptado de Obregón e Diaz, 2012)	16
Figura 2- Coleta de sêmen realizada através de vagina artificial	24
Figura 3- Variação anual da duração das horas de luz por dia durante o período experimental na cidade de Pedro Leopoldo, latitude 19° 37' sul e longitude 47° 02' oeste.....	27

Figura 4-	Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) de todos os touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$)	30
Figura 5-	Médias e desvio padrão bimestrais do vigor espermático (1-5) dos touros no período de 12 meses (n = 9). Letras diferentes indicam diferença estatística nos bimestres ($p \leq 0,05$)	31
Figura 6-	Médias e desvio padrão bimestrais do turbilhonamento (0-5) dos touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$)	32
Figura 7-	Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) dos touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$)	32
Figura 8-	Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) de todos os touros no período de um ano (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$)	33
Figura 9-	Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) de todos os touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$)	34
Figura 10-	Médias e desvio padrão bimestrais do número de espermatozoides morfologicamente normais (%) de todos os touros no período de 12 meses (n = 9). Letras diferentes indicam diferença estatística nos bimestres ($p \leq 0,05$)	35
Figura 11-	Médias e desvio padrão bimestrais do tempo de reação em segundos de todos os touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$)	38
Figura 12-	Proporção média bimestral (%) dos comportamentos sexuais observados de todos os animais no período pré-coleta (n = 9)	39

RESUMO

A espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) é considerada poliestral sazonal de dias curtos, possuindo uma maior atividade sexual nos meses frios. Nas fêmeas, este tema já é bem estudado e consolidado, entretanto, no macho, os estudos apresentam resultados conflitantes e em sua maioria realizados no Hemisfério Norte. Na presente dissertação avaliou-se a influência da sazonalidade sobre as características reprodutivas de machos bubalinos da raça Murrah criados em região de clima subtropical úmido na latitude 19° 37' 12" sul e longitude 44° 02' 38" oeste. Para isso, dividiu-se o ano em bimestres e o sêmen foi coletado uma vez por semana através do método da vagina artificial. As características físicas e morfológicas do sêmen foram avaliadas e o tempo de reação e os comportamentos sexuais observados foram anotados. Encontrou-se diferenças significativas apenas no vigor e na morfologia espermática. A partir disto, concluiu-se que búfalos criados na latitude do experimento, não sofreram influência da sazonalidade considerando-se as características reprodutivas avaliadas.

Palavras-chave: búfalos, Murrah, qualidade seminal, comportamento sexual, estacionalidade

ABSTRACT

Buffalo (*Bubalus bubalis*) is considered a seasonally polyestrous species with an improved efficiency on reproduction when the daylight decreases. While in females this subject is already well known, in male the studies are conflicting and the majority were done on North Hemisphere. In this thesis, the season influence on reproductive characteristics of male Murrah buffaloes raised in a humid subtropical region at latitude 19° 37' 12'' south and longitude 44° 02' 38'' west was evaluated. In this regard, the year were divided into bimesters and semen was collected once a week using an artificial vagina. The physical and morphological characteristics of the semen were evaluated and the reaction time and sexual behavior observed were noted. Significant differences in vigor and sperm morphology among months were found. Therefore, it was concluded that buffaloes raised in the latitude of this experiment were not influenced by seasonality considering the reproductive characteristics evaluated.

Keywords: buffaloes, Murrah, seasonality, seminal quality, sexual behavior

1- INTRODUÇÃO

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) é uma espécie oriunda da Ásia, sendo atualmente difundida em todos os continentes e sua atividade encontra-se em franca ascensão. De acordo com a FAO (2013), o rebanho bubalino brasileiro contabilizava aproximadamente 1,28 milhões de cabeças em 2013, apresentando um crescimento acumulado de 1910% no período entre 1961 a 2013. Nos anos 2010 e 2011, o rebanho bubalino foi o que mais cresceu no Brasil, sendo de 7,8% comparado a 1,6% do bovino (EBC, 2012). A região norte destaca-se nesta criação correspondendo a 64% do efetivo total brasileiro, concentrando-se principalmente no Pará. Em Minas Gerais, o efetivo foi de 45.251 cabeças no ano de 2012, totalizando 3,8% do rebanho nacional (IBGE, 2012).

O crescimento das últimas décadas justifica-se por alguns fatores, dentre eles a docilidade e o fácil manejo destes animais quando condicionados corretamente, a rusticidade e a boa adaptabilidade, obtendo bons índices zootécnicos nas mais diversas condições edafoclimáticas (Crudeli, 2011) e, adicionalmente, possuem características peculiares de leite e carne favoráveis ao mercado consumidor. É importante que esse crescimento populacional aconteça acompanhado de uma melhora na produtividade dos rebanhos, de forma que a sua atividade atraia cada vez mais adeptos (Baruselli & Carvalho, 2005). Para isso, é necessário o conhecimento de aspectos reprodutivos relativos ao macho e à fêmea bubalina melhorando, assim, a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

No Brasil, são criadas quatro raças bubalinas: Murrah, que se destaca pela produção de leite e a sua criação concentra-se no Sul do país e nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Jafarabadi, animal de dupla aptidão, Mediterrâneo, o qual também possui dupla aptidão, com destaque na produção leiteira e predomina na região Nordeste do país e a Carabao, utilizada como animal de tração e na produção de carne e sua criação concentra-se na região Norte, principalmente no estado do Pará (Marques *et al.*, 2006). As três primeiras raças citadas são consideradas búfalos do rio, com $2n = 50$ cromossomos e a Carabao é considerada búfalo do pântano, com $2n = 48$ cromossomos. Estas podem cruzar entre si gerando um indivíduo $2n = 49$ cromossomos (Vale *et al.*, 2008).

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie que, quando criada em localidades afastadas da linha do Equador, é influenciada positivamente pela redução das horas de luz por dia, sendo considerado um animal poliestral sazonal de dias curtos, semelhantemente aos caprinos e ovinos (Zicarelli, 1994). Porém, em regiões tropicais, próximas à linha do Equador, onde não ocorrem grandes variações de luminosidade durante o ano, essa espécie é considerada poliestral contínua, não sofrendo influência do fotoperíodo, podendo se reproduzir durante todo o ano, desde que a oferta de alimentos seja satisfatória e o animal seja mantido em boas condições de manejo (Vale, 1988).

Em fêmeas bubalinas, a influência do fotoperíodo na reprodução já foi bem estudada e se assemelha a de outros animais com características sazonais, como ovinos e caprinos, atuando como um sinal para a liberação de melatonina através da glândula pineal que estimula a secreção de hormônios hipofisários, principalmente o LH (Zicarelli, 1994). Dessa forma, em meses quentes, com dias mais longos, a atividade sexual da fêmea se torna reduzida e as taxas de concepção são menores (Tahir *et al.*, 1981 citado por Heuer *et al.*, 1987). No entanto, em machos bubalinos, a literatura ainda é bastante controversa, apresentando resultados bastante distintos. Sendo assim, diante do contexto de franca expansão do rebanho bubalino brasileiro, é de suma importância e necessidade conhecer a capacidade reprodutiva da espécie em diferentes regiões do

território brasileiro, principalmente pela grande extensão do país. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a influência da sazonalidade em relação à capacidade reprodutiva de machos bubalinos criados em região de clima tropical úmido, com períodos de chuva e seca bem delimitados e variações do fotoperíodo durante o ano.

2- OBJETIVOS

Avaliar o efeito da sazonalidade nos aspectos do sêmen e do comportamento reprodutivo de machos bubalinos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) criados no município de Pedro Leopoldo – MG, região de clima subtropical úmido, localizado na latitude 19° 37' 12" sul e longitude 44° 02' 38" oeste.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Sazonalidade reprodutiva

A sazonalidade reprodutiva é uma característica desenvolvida por diferentes mamíferos silvestres para garantir a sobrevivência de seus descendentes, de forma que eles nasçam em épocas mais favoráveis, com melhores condições climáticas e melhor oferta de alimento para as suas subsistências (Di Francesco, 2010). O búfalo (*Bubalus bubalis*) é proveniente da Ásia e sua característica sazonal surgiu devido às suas origens tropicais, de áreas situadas ao norte da Linha do Equador em que o período de maior oferta de alimento coincide com as estações em que ocorre uma diminuição das horas de luz por dia. Por isso, só sobreviveram naquela época os animais que tinham seus filhotes nessa época do ano (Shimizu, 1988).

A estacionalidade ocasiona concentração de partos, o que facilita o manejo nas propriedades e essa característica pode ser benéfica ou desvantajosa de acordo com o tipo de produção. Em fazendas de corte ela é desejável visto que concentra toda a cadeia produtiva desde a época de parição, desmama, terminação até o abate. Já propriedades leiteiras e laticínios não desejam isso, uma vez que após a desmama da maioria dos bezerros, há uma redução da produção de leite pelas búfalas e, conseqüentemente, comprometimento da comercialização do leite e seus derivados (Barile, 2005).

A Itália é um desses lugares em que a sazonalidade e, conseqüentemente, a concentração de partos, é indesejável uma vez que a principal exploração da criação bubalina na região é a leiteira para a produção do tradicional queijo “mozzarella” e a demanda de mercado desse produto é maior no verão e primavera, enquanto o pico de produção de leite é no outono e inverno, meses em que se concentram os partos. Dessa forma, para resolver esse entrave, foi adotada uma estratégia denominada OBSM (“Out of Breeding Season Mating”) que consiste em separar o touro do rebanho entre os meses de setembro a dezembro no primeiro ano e de setembro a março nos anos subsequentes, alterando assim a estação de monta e concentrando os partos na primavera (Barile, 2005; Di Francesco, 2010).

A influência da estação do ano sobre a reprodução ocorre de forma direta e indireta. Diretamente através de fatores macro e microclimáticos como a temperatura, umidade relativa do ar, pluviosidade e fotoperíodo. Indiretamente através da vegetação, qualidade e disponibilidade de forragem, os quais afetam a nutrição dos animais além de períodos de inundação (Bhakat *et al.*,

2015).

Nos bubalinos, a sazonalidade é expressa em regiões afastadas da linha do equador e, dessa forma, não depende apenas da disponibilidade de comida ou da condição metabólica do animal, mas também do fotoperíodo, pois a redução da luz diária influencia diretamente na secreção de melatonina (Parmeggiani *et al.*, 1993) e das condições ambientais, principalmente temperatura e umidade do ar. Dessa forma, no Brasil, búfalos criados nas regiões centro-sul, tendem a apresentar sazonalidade reprodutiva (Jacomini, 1989) enquanto que aqueles criados no norte do país mostram uma atividade poliestral contínua, podendo se reproduzir durante todo o ano, caso estejam bem nutridos e bem manejados (Vale, 1988). Assim, na região Amazônica, localizada na zona equatorial e, conseqüentemente, sem a influência do fotoperíodo, Vale (1988) relatou haver uma concentração das parições, especialmente em criações extensivas, devido a fatores ambientais como temperatura e umidade e pela disponibilidade e qualidade de alimento.

3.1.1- Nutrição

Em locais que o fotoperíodo é constante, a principal influência da sazonalidade reprodutiva em mamíferos é o estado nutricional do animal (Di Francesco, 2010). A pouca disponibilidade de forragem e a sua baixa qualidade devido a períodos de seca ou calor intenso é extremamente danoso à eficiência reprodutiva dos bubalinos (Vale, 2007).

Mamíferos em que o gasto energético excede a ingestão de calorias entram em balanço energético negativo e tem como resultado, entre outras coisas, perda de condição corporal. Isso tem um impacto direto na reprodução, uma vez que nesse estado há, principalmente, uma diminuição dos níveis de glicose e ácidos graxos e, conseqüentemente, a diminuição ou mesmo inibição da secreção dos pulsos de GnRH pelo hipotálamo. Isso ocorre em todos os mamíferos (Vale, 2007; Bronson, 2009), inclusive no búfalo. Wade & Jones (2004) hipotetizaram que a deficiência desses metabólitos é percebida por células presentes no rombencéfalo (ponte, cerebelo e bulbo), que produzem neuropeptídios Y (NPY) e catecolaminas. Esses neurotransmissores, então, transmitem essa informação ao prosencéfalo (cérebro) aonde irá causar a depressão dos pulsos de GnRH, direta ou indiretamente, via hormônio liberador de corticotrofina (CRH).

A nutrição é importante para o início da puberdade, manutenção da ciclicidade ovariana, retorno à ciclicidade no pós-parto, intervalo entre partos, período de serviço e na manutenção da gestação, ou seja, na fertilidade da fêmea como um todo. Dessa forma, o balanço energético positivo e o escore de condição corporal são essenciais para um retorno precoce à atividade reprodutiva no pós-parto (Garcia, 2006; Vale 2007).

Devido à essa importância e à estreita relação entre nutrição e reprodução, a adoção de estratégias de suplementação alimentar em períodos de maior restrição de chuva e menor disponibilidade de forragem é extremamente vantajosa e necessária para a melhoria dos índices reprodutivos de um rebanho bubalino (Garcia, 2006).

3.1.2- Clima

O clima está diretamente ligado à qualidade e disponibilidade de forragem, influenciando diretamente na nutrição dos animais. Além disso, em regiões tropicais e subtropicais, o estresse térmico causado por altas temperaturas é considerado o principal entrave para a produtividade de um rebanho e o seu efeito é agravado quando acompanhado por alta umidade do ar (Marai &

Haeeb, 2010) uma vez que reduz a evaporação de suor e, conseqüentemente, a dissipação de calor se torna mais complicada (West, 1994)

Para medir de forma eficaz o potencial de um ambiente em causar estresse térmico nos animais, um índice foi desenvolvido. Esse índice, denominado índice de temperatura e umidade (ITH), leva em consideração a temperatura e a umidade relativa do ar (LPHSI, 1990 citado por Marai & Haeeb, 2010). Em trabalhos realizados na Tailândia, foram estabelecidas quatro categorias para a espécie bubalina para os valores de ITH do país: $ITH \leq 74$ não leva a nenhum problema de saúde ao animal; ITH entre 75 e 78 os animais já começam a sofrer estresse térmico e a perder peso; ITH entre 79 e 83 já é considerado de risco e os animais começam a sofrer bastante com o estresse térmico e $ITH \geq 84$ é considerado estado emergencial e os animais correm o risco de morte (Garcia, 2006; Vale, 2007). No Brasil, segundo proposição de Baccari Junior *et al.* (1986), o limite de ITH que os bubalinos possuiriam tolerância ao calor seria de 75 (Garcia, 2006).

Esses valores citados acima correspondem à fórmula desse índice que utiliza a temperatura em graus Fahrenheit e, por isso, Marai *et al.* (2001) adaptou a fórmula de ITH para graus Celsius e chegou às seguintes categorias para ruminantes domésticos (bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos): $ITH \leq 22,2$, ausência de estresse térmico; ITH entre 22,3 e 23,2, moderado estresse térmico; ITH entre 23,3 e 25,6, severas condições térmicas e estado de alerta e $ITH \geq 25,6$, estresse térmico extremamente severo e animais com risco de morte (Marai & Haeeb, 2010).

De acordo com Ohashi *et al.* (1988), a principal causa de degeneração testicular em búfalos na bacia Amazônica, que leva a uma queda significativa na concentração e na motilidade espermática e um aumento do número de espermatozoides anormais, é o estresse térmico. Relatos similares foram feitos em carneiros e bodes (Chemineau, 1993; Coelho *et al.*, 2006). Entretanto, apesar desses relatos, resultados diferentes em búfalos foram apresentados por Chacur *et al.* (2001). Os autores relataram diferenças significativas apenas no volume do ejaculado, sendo este menor nos animais que sofreram estresse térmico. Os animais foram mantidos em uma sala climatizada com temperatura de 39°C e umidade relativa do ar entre 60 e 95% durante 9 horas por dia em 54 dias do experimento.

O búfalo possui algumas características morfológicas, anatômicas e comportamentais que o tornam capazes de se adaptar a ambientes quentes e úmidos (Marai & Haeeb, 2010). Sua pele negra e grossa contém muitas partículas de melanina que chegam a absorver entre 70 e 90% da radiação solar incidente, sendo um importante mecanismo de defesa contra os raios ultravioleta. A exposição excessiva a esse tipo de raio pode ser maléfica ao animal com alguns chegando até a desenvolver tumores de pele (Vale, 2007). Além disso, suas glândulas sebáceas são mais desenvolvidas e secretam mais sebo que os bovinos. Essa substância oleosa age como um lubrificante e é secretada na pele, lubrificando-a e prevenindo que materiais químicos ou tóxicos presentes na água sejam absorvidos pela epiderme (Campanile & Balestrieri, 2002; Shafie, 2005). Com isso, a característica comportamental de se refrescarem imersos na água ou no barro por até 5 horas por dia pode ser realizada sem danos aos animais (Marai & Haeeb, 2010).

Apesar de todas essas características benéficas contra o estresse térmico, o búfalo é um animal sensível à exposição direta à luz solar em locais com temperaturas extremas devido à sua pele negra e espessa, além de possuir baixa concentração de glândulas sudoríparas na pele, o que dificulta a dissipação de calor. Por isso, faz-se necessário locais de sombreamento nessas criações (Vale, 2007).

3.1.3- Fotoperíodo

A influência do fotoperíodo na reprodução dos búfalos ocorre de maneira semelhante à de ovinos e caprinos. O fotoperíodo atua como um sinal para a liberação de melatonina através da glândula pineal que estimula a secreção de hormônios hipofisários, principalmente o LH (Zicarelli, 1994). Essa influência significa que caso não haja nenhuma intervenção, os búfalos possuem ciclos sazonais de concepção, parto e produção de leite (Campanile *et al.*, 2010).

Algumas estratégias já são utilizadas em ovinos, caprinos e equinos visando reduzir a influência do fotoperíodo na reprodução dessas espécies como a utilização de implantes de melatonina exógena e programas de luz artificial (Hafez & Hafez, 2004). No entanto, ovinos e caprinos quando mantidos expostos ao estímulo de dias curtos possuem o risco de se tornarem fotorrefratários. Isso também pode ocorrer em condições naturais, pois os animais desenvolvem ao final da estação insensibilidade reprodutiva aos dias curtos. Portanto, a exposição a menos horas de luz por dia não atrasa a sua transição para a estação não reprodutiva. Isso ocorre devido ao fato de que a resposta ao fotoperíodo necessita de uma exposição prévia ao fotoperíodo anterior, ou seja, o animal necessita ser exposto a dias longos antes dos dias curtos para responder a esse estímulo do fotoperíodo (Karsch *et al.*, 1986; Chemineau *et al.*, 1992).

3.1.3.1- Melatonina

A melatonina é um hormônio produzido, armazenado e secretado pela glândula pineal. Os pinealócitos, células responsáveis por essa função, atuam através de um padrão secretório rítmico, com maior liberação na ausência de luz e quase nenhuma na sua presença (Souza Neto & Scaldaferrri, 2004). Durante o dia, a melatonina é produzida e armazenada na glândula pineal, sendo liberada durante a noite, após o sol se pôr e antes do sol nascer, sendo regulada pelo ritmo luz-escuridão (Karsch *et al.*, 1984).

As funções desse hormônio são várias, incluindo: regulação do ciclo circadiano, ação antioxidante e indução, em ovinos, caprinos e bubalinos ou supressão em equinos, da atividade reprodutiva (Malpaux *et al.*, 1996).

Como já mencionado, a produção e armazenamento de melatonina é realizada durante o dia e ocorre através da percepção da luz por fotorreceptores presentes na retina. Essa mensagem então é transmitida por uma via que envolve diferentes conexões neurais. Primeiramente ela é enviada ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo (regulador do ciclo circadiano), onde é interpretada e enviada até o gânglio cervical superior que redireciona o sinal até a glândula pineal, onde ocorrerá a síntese da melatonina a partir do aminoácido triptofano. A sua liberação ocorrerá apenas à noite e a duração e quantidade de melatonina liberada vai variar de acordo com a duração do dia (Karsch *et al.*, 1984) (Figura 1). Segundo Mies Filho (1984), ainda existem os fotorreceptores extrarretinais que mantêm os estímulos luminosos em caso de animais cegos.

Em búfalos, à medida que o dia se torna menor, com diminuição das horas de luz, a liberação e, conseqüentemente, a exposição à melatonina se tornam maiores. Esse hormônio, então, atua no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, estimulando um aumento da frequência de pulsos de GnRH e simulando o início do estro (Di Francesco, 2010).

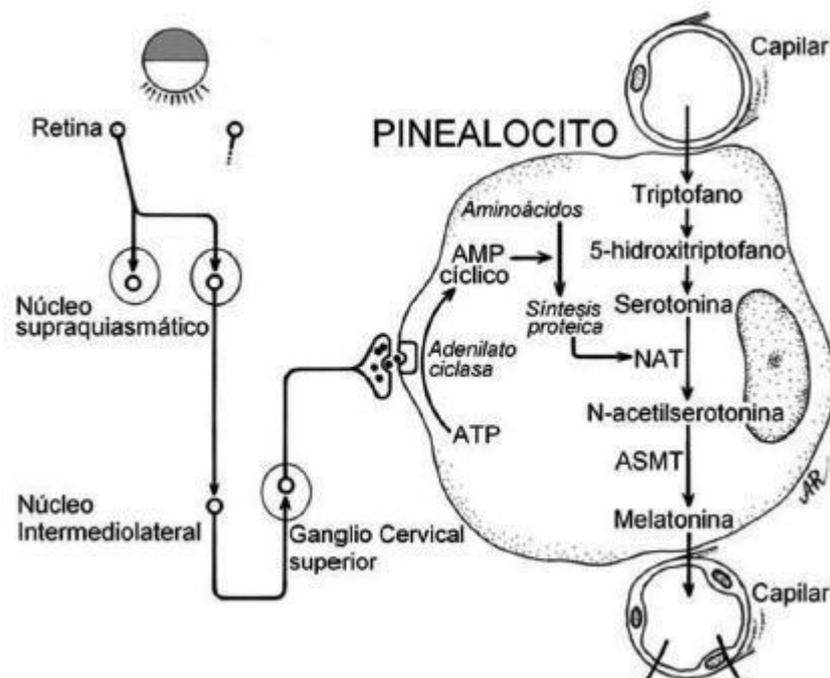


Figura 1 – Esquema da via retino-hipotalâmica de síntese de melatonina (Adaptado de Obregón & Diaz, 2012)

A atuação da melatonina no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, porém, é realizada de forma indireta e Malpaux *et al.* (1996) citaram três razões para justificar essa colocação:

- 1ª) os supostos locais de atuação da melatonina não são os mesmos dos neurônios GnRH;
- 2ª) em experimentos realizados utilizando-se implantes de melatonina, houve uma grande demora para a resposta do GnRH na liberação de LH, sugerindo uma forma de regulação bem mais complexa;
- 3ª) foram descritos vários neurotransmissores que atuam nessa regulação como a dopamina e serotonina, que inibem a secreção de LH e aminoácidos excitatórios, que seriam os responsáveis por mediar a secreção de GnRH através da melatonina.

São dois os receptores específicos de melatonina, MTNR1A e MTNR1B, no entanto apenas o primeiro está envolvido na atividade reprodutiva.

O receptor MTNR1A é um receptor de melatonina presente em grandes concentrações na parte tuberal da adeno-hipófise (Carcangiu *et al.*, 2011). Está envolvido na inibição de descargas neuronais no núcleo supraquiasmático e na inibição de secreção de prolactina na parte tuberal, além de induzir vasoconstrição (Dubocovich *et al.*, 2003). Não foi encontrada melatonina ligada em nenhuma outra porção da adeno-hipófise (Skinner & Robinson, 1995). Segundo Carcangiu *et al.* (2001), o receptor MTNR1A do búfalo possui o mesmo número de nucleotídeos que outras espécies como ovinos, caprinos e bovinos, apresentando uma similaridade estrutural de mais de 97% com os bovinos. Os autores relataram a existência de um polimorfismo na posição 82 em

certos búfalos e essa mutação possui relação com a sazonalidade reprodutiva de maneira que, aqueles indivíduos carregando o determinado genótipo C/C possuíam atividade reprodutiva mais ativa em época de dias curtos, enquanto aqueles com genótipo T/T continuavam a se reproduzir mesmo com o aumento das horas de luz por dia.

O polimorfismo desse gene também tem relação com algumas características produtivas e reprodutivas na espécie bubalina. Animais com o genótipo T/T apresentaram maior teor de proteína no leite (Zetouni *et al.*, 2014) e, juntamente com os animais com o genótipo C/T, exibiram um intervalo entre o primeiro e o segundo partos menores do que aqueles com genótipo C/C (Luridiana *et al.*, 2012).

3.2- A sazonalidade reprodutiva da fêmea bubalina

A fêmea bubalina, comprovadamente, possui maior atividade reprodutiva nos meses de dias curtos e quanto mais afastada da linha do equador, mais marcante é essa característica (Parmeggiani *et al.*, 1993; Zicarelli, 1994). Dessa forma, a estação de monta desta espécie é no outono e a concentração de partos ocorre nos meses de julho a dezembro, no hemisfério norte, e de janeiro a maio no hemisfério sul. Nos meses quentes, é comum a ocorrências deaios “silenciosos” ou ciclos estrais irregulares (Siqueira *et al.*, 2009).

A redução da atividade reprodutiva da fêmea é demonstrada por uma redução na incidência do comportamento típico de estro, irregularidade do ciclo estral e baixas taxas de concepção (Zicarelli, 1997 citado por Campanile *et al.*, 2010).

No estado do Pará, em criações de terra firme, ou seja, com adequado manejo nutricional e mineral, 89,3% dos partos ocorreram entre abril e agosto, enquanto propriedades em que os animais são criados em áreas de pântano, a concentração dos partos foi de setembro a dezembro (Nascimento & Carvalho, 1979; Ribeiro, 2006). Resultados similares foram encontrados por Rolim Filho e colaboradores (2009) ao realizarem um trabalho retrospectivo dos anos de 1974 a 2005 na região Amazônica. Já na região centro-sul do país, trabalhos conduzidos em Sertãozinho (Pacola *et al.*, 1978), no Vale da Paraíba (Mosse, 1979), no Vale do Ribeira (Baruselli *et al.*, 1993) e em Pirassununga (Mattos *et al.*, 2000), todas localizadas no estado de São Paulo, entre as latitudes 21° e 24° sul, relataram maiores taxas de parto no primeiro semestre, principalmente entre fevereiro e maio. O mesmo ocorre na região nordeste, no estado do Ceará, latitude 3° sul, o qual ocorreram 79,3% dos partos na estação chuvosa, ou seja, no primeiro semestre (Sampaio Neto *et al.*, 2001).

A visualização de estros também segue uma tendência sazonal. Em trabalho realizado por Baruselli *et al.* (1993) no Vale do Ribeira, São Paulo, os pesquisadores observaram 93,03% dos estros nos meses de março a julho durante o ano, ou seja, concentrados no outono e inverno. Na Amazônia, em propriedades de terra firme, a maior concentração dos estros apareceu durante a estação chuvosa e no final dela, ou seja, entre os meses de janeiro e junho, em períodos de maior disponibilidade de forragem (Ribeiro, 2006). Resultados similares foram encontrados na Índia (Singh, 2000) e no Egito (Elwishy, 1971), os quais relataram mais de 60% dos estros observados entre setembro e dezembro, ou seja, no outono.

Segundo Bahga & Gangwar (1988) a involução uterina no pós-parto de búfalas é mais rápida no verão do que no inverno e foi sugerido que isso ocorre devido a uma maior produção de prostaglandina F2- α pelo útero que aumenta a vasoconstrição e as contrações que levam a uma

necrose celular mais rápida e, conseqüentemente, eliminação dos restos placentários. Conquanto, os mesmos autores ressaltam que apesar do primeiro cio pós-parto ser mais rápido no verão, devido a uma involução uterina mais rápida, as taxas de concepções são menores. Búfalas que têm a sua cria no outono, tendem a possuir um menor período de anestro pós-parto uma vez que o período de volta à ciclicidade ovariana corresponde ao início do período de dias curtos (Barile, 2005).

3.3- A sazonalidade reprodutiva do macho bubalino

Enquanto em fêmeas bubalinas a influência da sazonalidade na reprodução já foi bem estudada e relatada, em machos, a literatura é bastante controversa. Relatos sobre diminuição da atividade sexual e diferença na qualidade do sêmen fresco e congelado durante o ano foram descritas por alguns autores, tanto em búfalos do pântano (Koonjaenak *et al.*, 2007b) quanto em búfalos do rio (Elsawaf *et al.*, 1971; Tuli & Singh, 1983; Heuer *et al.*, 1987; Di Francesco, 2010; Ferrer *et al.*, 2010; Nam, 2010) em diferentes latitudes. Porém, Ohashi *et al.* (1988) descreveram que a influência da sazonalidade presente no macho bubalino na zona equatorial não está relacionada ao fotoperíodo mas sim a uma menor oferta de alimento associada ao aumento de temperatura ambiental e dos raios solares, podendo ser superada melhorando-se o manejo e a alimentação destes animais.

3.3.1- Qualidade seminal

Diferentes resultados obtidos por trabalhos envolvendo a influência da estação do ano sobre a qualidade seminal de bubalinos entre os anos de 1971 e 2015 estão citados na Tabela 1. Há relatos de diferenças sazonais em todos parâmetros espermáticos e os resultados são controversos.

Foi reportado um maior volume espermático no verão (Di Francesco, 2010; Sharma *et al.*, 2014) nas latitudes 27° e 45° norte, respectivamente; no outono (Elsawaf *et al.*, 1971; Javed *et al.*, 2000), nas latitudes 30° e 31° norte; na primavera (Ferrer *et al.*, 2010; Di Francesco 2010) nas latitudes 23° e 45° norte, respectivamente e também menor no verão (Castro *et al.*, 1994) na latitude 22° sul.

Com relação à concentração espermática, foram reportados maiores valores no verão (Heuer *et al.*, 1987; Sharma *et al.*, 2014); no outono (Elsawaf *et al.*, 1971; Khan *et al.*, 1997) e no inverno (Mayahi *et al.*, 2014; Bhakat *et al.*, 2015). Todos esses trabalhos foram realizados entre as latitudes 26° e 31° norte.

A motilidade apresentou maiores valores nos meses de dias curtos e mais frios em trabalhos conduzidos nas latitudes 26° e 31° norte, tanto no inverno (Tiwari *et al.*, 2011; Mayahi *et al.*, 2014; Bhakat *et al.*, 2015) quanto no outono (Khan *et al.*, 1997). Porém, valores maiores na estação chuvosa (julho a setembro) também foram reportados por Sharma *et al.* (2015), na latitude 27° norte.

Com relação à morfologia espermática, foi relatado maior número de defeitos no verão na latitude 23° norte (Ferrer *et al.*, 2010), com 33,8% de espermatozoides patológicos e na latitude 45° norte (Bhakat *et al.*, 2015), com 12,11%. Ao contrário, Di Francesco (2010) na latitude 45° norte encontrou maior número no inverno e outono, apresentando cerca de 36,8% e 34,2% respectivamente. A integridade de membrana através do teste hiposmótico também sofre variação de acordo com alguns autores, sendo relatado maior número de espermatozoides reativos a esse

teste no inverno na latitude 29° norte (Mandal *et al.*, 2003; Bhakat *et al.*, 2015) e no verão (Koonjaenak *et al.*, 2007a).

As características físicas e morfológicas do sêmen não são totalmente satisfatórias para o seu julgamento e, por isso, avaliações da composição bioquímica do plasma seminal se fazem necessárias (Mann & Lutwak-Mann, 1981 citado por Pandey *et al.*, 2014). Dessa forma, alguns trabalhos relataram a influência da sazonalidade na composição proteica do plasma seminal. Singh *et al.* (1969) relataram maior conteúdo proteico no inverno e primavera, resultado que contrasta com os encontrados por Sharma *et al.* (2014), havendo maior expressão proteica no verão. Além disso, uma maior concentração dos minerais cálcio, magnésio, zinco e ferro no plasma seminal de bubalinos no inverno também foi relatado (Abdel-Salam & Harith, 2012).

Enzimas como a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são bons indicadores da qualidade seminal. Estas mensuram a estabilidade da membrana plasmática e o dano acrossomal dos espermatozoides e suas concentrações variam de acordo a estação, ocorrendo maiores níveis no verão chuvoso (junho e julho no hemisfério norte). Dessa forma, nesse período, foi observado maior número de espermatozoides com a membrana plasmática danificada (Bhosrekar *et al.*, 1991; Pandey *et al.*, 2014). Semelhantemente, ocorre aumento da fosfatase alcalina (FA), do colesterol e de triglicerídeos nesse mesmo período do ano (verão) (Pandey *et al.*, 2014). Os dois últimos estão presentes na composição da membrana plasmática do espermatozoide e são responsáveis por manter a sua estabilidade.

A frutose é uma importante fonte de energia para os espermatozoides, presente no plasma seminal dos mamíferos e foram relatados maiores níveis desse açúcar no inverno e primavera (Elsawaf *et al.*, 1971) e menores no verão (Castro *et al.*, 1994).

Tabela 1. Características seminais de touros bubalinos coletados através de vagina artificial, de acordo com a estação, em diferentes trabalhos publicados de 1971 a 2015

Características avaliadas	Localização do trabalho	Raça	Resultados encontrados	Referência	Obs.
Características físicas do sêmen	Ludhiana, Índia Latitude: 30° N	Murrah (Búfalo do rio)	Nenhum parâmetro espermático apresentou diferença no sêmen fresco	Bahga & Khokar, 1991	Coletas duas vezes por semana durante um ano.
Características físicas do sêmen	Nova Odessa, Brasil Latitude: 22° S	Mediterrâneo (Búfalo do rio)	Menor volume espermático no verão.	Castro <i>et al.</i> , 1994	Coletas semanais por todo o ano.
Características físicas do sêmen	Qadirabad, Paquistão Latitude: 30° N	Nili-Ravi (Búfalo do rio)	Menor motilidade e concentração espermática em junho e maior motilidade e concentração espermática em outubro.	Khan <i>et al.</i> , 1997	Sêmen coletado duas vezes por semana durante um ano.
Características físicas do sêmen	Faisalabad, Paquistão Latitude: 31° N	Nili-Ravi (Búfalo do rio)	Maior volume espermático e turbilhonamento durante o outono e menor concentração espermática na primavera.	Javed <i>et al.</i> , 2000	Coletas quinzenais durante todo o ano.

Características avaliadas	Localização do trabalho	Raça	Resultados encontrados	Referência	Obs.
Características físicas do sêmen	Ahvaz, Iran Latitude: 31° N	Khuzestan (Búfalo do rio)	Maior volume, concentração espermática e motilidade progressiva no inverno	Mayahi <i>et al.</i> , 2014	Coletas quinzenais durante o verão e o inverno.
Características físicas e morfológicas do sêmen	Giza, Egito Latitude: 30°N	-	Volume espermático, concentração espermática e número total de espermatozoides maiores no outono	Elsawaf <i>et al.</i> , 1971	Coletas semanais durante todo o ano
Características físicas e morfológicas do sêmen	Qadirabad, Paquistão Latitude: 30° N	Nili-Ravi (Búfalo do rio)	Maior número total de espermatozoides e concentração espermática no mês de junho (fora da estação)	Heuer <i>et al.</i> , 1987	Coletas em junho e novembro
Características físicas e morfológicas do sêmen	Khon-Khaen, Tailândia Latitude: 16° N	Búfalo do pântano	Maior integridade de membrana plasmática através do teste hiposmótico.	Koonjaenak <i>et al.</i> , 2007a	Coletas semanais durante um ano.
Características físicas e morfológicas do sêmen	Havana, Cuba Latitude: 23° N	Búfalo do rio	Maior volume espermático de março a maio (primavera) e maior número de anormalidades morfológicas de junho a agosto (verão).	Ferrer <i>et al.</i> , 2010	Coletas semanais por um período de onze meses (setembro a julho).
Características físicas e morfológicas do sêmen	Cremona, Itália Latitude: 45° N	Mediterrâneo (Búfalo do rio)	Maior volume espermático, motilidade e espermatozoides morfológicamente normais de abril a setembro.	Di Francesco, 2010	Duas coletas por semana durante um ano.
Características físicas e morfológicas do sêmen	Mathura, Índia Latitude: 27°N	Bhadawari (Búfalo do rio)	Maior volume, concentração espermática, integridade de membrana no teste hiposmótico e no verão enquanto a motilidade espermática foi maior na estação chuvosa (julho a setembro)	Sharma <i>et al.</i> , 2014	Coletas realizadas duas vezes por semana
Características físicas e morfológicas do sêmen	Karnal, Índia Latitude: 29° N	Murrah (Búfalo do rio)	Maior motilidade, concentração espermática, integridade de membrana no teste hiposmótico e menor número de anormalidade morfológicas no inverno.	Bhakat <i>et al.</i> , 2015	Uma coleta realizada por semana pelo período de um ano
Características físicas do sêmen fresco e congelado	Salon, Índia Latitude: 26° N	Murrah (Búfalo do rio)	Maior motilidade espermática pós-descongelamento e menor concentração espermática no inverno.	Tiwari <i>et al.</i> , 2011	Duas coletas por semana por um período de três anos.

Características avaliadas	Localização do trabalho	Raça	Resultados encontrados	Referência	Obs.
Características do movimento e da estrutura do espermatozoide	Karnal, Índia Latitude: 29° N	Murrah (Búfalo do rio)	Maior número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico no inverno	Mandal <i>et al.</i> , 2003	Coletas semanais durante o ano inteiro.
Características do movimento e da estrutura do espermatozoide	Khon-Khaen, Tailândia Latitude: 16° N	Búfalo do pântano	Maior integridade e estabilidade de membrana plasmática pós-descongelamento no sêmen congelado no inverno.	Koonjaenak <i>et al.</i> , 2007a	Coletas semanais durante um ano.
Características do sêmen congelado	Ludhiana, Índia Latitude: 30° N	Murrah (Búfalo do rio)	Maior motilidade pós-descongelamento e maior resistência ao congelamento em sêmen congelado no inverno.	Tuli & Singh, 1983	Coletas realizadas no verão (maio a agosto) e no inverno (dezembro a março).
Características do sêmen congelado	Uruli-Kanchan, Índia Latitude: 18° N	Murrah (Búfalo do rio)	Maior número de espermatozoides vivos e normais no outono.	Bhosrekar <i>et al.</i> , 1991	Coletas realizadas durante todo o ano.

3.3.2 – Comportamento sexual

O comportamento sexual do macho bubalino é influenciado pela sazonalidade, principalmente devido ao clima, expressando maior libido e interesse sexual durante as horas mais amenas do dia, ou seja, durante à noite, logo após o pôr do sol, ou mesmo de madrugada (Ohashi *et al.*, 1988). O estresse térmico diminui a libido dos animais (Bhattacharya, 1991).

A libido pode ser expressa através do tempo que o animal demora a ejacular depois de ser apresentado à fêmea, denominado tempo de reação, e não foi relatado diferenças significativas durante o ano na latitude 29° norte (Dixit *et al.*, 1984). Os mesmos autores, porém, relataram uma maior porcentagem de recusa dos animais à monta e, conseqüentemente, ejaculação no verão, devido às altas temperaturas do período. Resultados diferentes foram relatados por El Sawaf *et al.* (1971) que encontraram maior atividade sexual na primavera e menor no outono.

3.3.3- Outros fatores envolvidos na reprodução

A função reprodutiva dos mamíferos também é regulada pelos nervos autônomos que inervam o sistema reprodutivo, principalmente os ductos deferentes e as glândulas acessórias. Trabalhos realizados em ratos (Kepper & Keast, 1995), em caninos (Hedlund *et al.*, 1996), em equídeos (Arrighi & Domeneghini, 1997) e em suínos (Kaleczyc *et al.*, 1997) demonstraram as características morfológicas, químicas e a função na reprodução desse tipo de inervação nas diferentes espécies. Em búfalos, Mirabella *et al.* (2003) avaliaram a relação entre esses nervos e a sazonalidade reprodutiva e reportaram a presença de distintas populações de nervos inervando os ductos deferentes e as glândulas acessórias de bubalinos e a presença de fibras adrenérgicas nesses mesmos órgãos durante o outono e inverno diferentemente da primavera e verão que ocorre

quase completo desaparecimento dessas estruturas. Os autores, então, sugeriram existir um mecanismo, ainda não relatado, muito mais complexo por trás da regulação da reprodução do macho bubalino, envolvendo uma maior inervação e a presença de outros componentes como fibras adrenérgicas no trato genital masculino em períodos de maior atividade sexual.

Outro importante composto para a reprodução é o óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre inorgânico produzido no sistema nervoso central, ovário, em células endoteliais e nos testículos e sua secreção é influenciada pela melatonina. Por isso, sugere-se que esse composto atue aumentando a liberação pulsátil de GnRH e a sensibilidade hipofisária ao GnRH além de ser importante na maturação e capacitação espermática (Scala & Maruccio, 2012). Scala & Maruccio (2012) ao estudarem a concentração de óxido nítrico em epidídimos de machos bubalinos em 3 estações climáticas diferentes (primavera, verão e inverno) encontraram uma maior presença do composto nos ductos deferentes nos períodos de menor luminosidade, ou seja, de maior atividade gonadal nesta espécie. Os autores concluíram que esses achados corroboram com achados de outros autores com relação à função do óxido nítrico na maturação, capacitação e motilidade do espermatozoide, além de sua participação na regulação da atividade reprodutiva sazonal.

3.4- Endocrinologia da reprodução do búfalo

Dos hormônios produzidos pela hipófise o FSH e o LH atuam em conjunto, na fêmea, promovendo o crescimento e maturação folicular e um pico do segundo é responsável pela ovulação. No macho, o FSH atua, principalmente, promovendo a espermatogênese nas células de Sertoli e o LH na produção de andrógenos nas células de Leydig (Hafez & Hafez, 2004).

A endocrinologia do macho e da fêmea sofre mudanças durante o ano (Nam, 2010). Durante os meses mais frios, ou seja, com dias mais curtos, foi relatado maiores concentrações de FSH e LH quando comparado com meses mais quentes (Razdan *et al.*, 1982; Rao & Pandey, 1983).

Os hormônios gonadais produzidos no ovário e no testículo são, respectivamente, o estrógeno (E2) e a progesterona (P4), e a testosterona. O E2 e a testosterona são responsáveis pelo comportamento sexual e pelas características sexuais secundárias, além de participarem da foliculogênese e espermatogênese, respectivamente. A P4 prepara o trato reprodutivo para a gestação (Hafez & Hafez, 2004).

O mesmo relatado para os hormônios gonadotrópicos ocorre com a testosterona em machos bubalinos (Perera *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1991) e com o estradiol e a progesterona em fêmeas bubalinas (Rao & Pandey, 1982; Rao & Pandey, 1983; Roy & Prakash, 2007). Ocorre uma maior concentração desses três hormônios nessa espécie nos meses mais frios, ou seja, no período de menor luminosidade. Por outro lado, outros autores relataram maiores níveis de P4 (Dixit *et al.*, 1985) e testosterona (Dixit *et al.*, 1985; Malfatti *et al.*, 2006) no verão, contrastando com os trabalhos citados anteriormente.

O padrão endocrinológico de menores concentrações de FSH, LH, estrógeno, progesterona e testosterona seria um dos responsáveis pela baixa libido e comportamento sexual de bubalinos nas estações de menor atividade reprodutiva (Nam, 2010).

Outros hormônios, também importantes para a reprodução, foram avaliados com relação à sua concentração durante o ano como a inibina, a triiodotironina (T3) e a Tiroxina (T4). A inibina é

produzida pelas células da granulosa no ovário e pelas células de Sertoli no testículo, e atua inibindo a secreção de FSH pela hipófise. Foram relatadas em fêmea bubalinas maiores concentrações no inverno do que no verão (Palta *et al.*, 1997).

Já a T3 e T4 são produzidas pela tireóide. O primeiro tem, entre outras funções, a maturação das células de Sertoli através de variadas ações (Arambepola *et al.*, 1998), já o segundo participa diretamente da diferenciação das células de Sertoli (Buzzard *et al.*, 2003). Avallone *et al.* (1994) relataram um aumento nos níveis desses dois hormônios entre novembro e abril (inverno e primavera na Itália). Os mesmos autores relataram uma redução dos níveis de prolactina nesse mesmo período e, com isso, concluíram que ocorreu uma correlação negativa entre o T3 e o T4 com a prolactina. Resultados diferentes foram encontrados por Mayahi *et al.* (2014), que relataram maiores níveis de T4 no verão e de T3 ligadas a proteína no inverno. Já Dixit *et al.* (1984) não encontraram diferenças nos níveis desses dois hormônios durante o ano.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Local do experimento

O presente trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura (CBB), sediado na Fazenda Modelo, no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, região de clima subtropical úmido com altitude média de 710 metros, latitude 19° 37' 12" sul, longitude 44° 02' 38" oeste e média de temperatura anual de 20,9°C.

4.2 – Animais utilizados

Foram utilizados 9 touros búfalos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) com idades entre 28 e 45 meses. Todos os animais foram avaliados clinicamente e andrologicamente com parâmetros espermáticos referidos por Vale *et al.* (2008) e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) antes do início das coletas como demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros espermáticos do ejaculado de touros bubalinos coletados através de vagina artificial referidos por Vale *et al.* (2008) e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013)

Características	Valores
Volume (mL)	3 (2-8)
Cor	Branca marfim
Movimento de massa (0-5)	≥ 3
Motilidade espermática (%)	≥ 70
Vigor (1-5)	≥ 3
Concentração espermática	300 – 1200 x 10 ⁶ /mL
Número total de espermatozoides	~ 3 x 10 ⁹
Espermatozoides morfologicamente normais (%)	≥ 70

Os animais nasceram na região de Pedro Leopoldo, foram transportados até a Fazenda Modelo no período pré-puberal, com aproximadamente 12 meses, e mantidos naquela propriedade desde então. O treinamento dos machos para a coleta de sêmen foi iniciado no período puberal, sendo os animais condicionados e manejados semanalmente. A partir de 23 meses foi intensificado o processo de treinamento para coleta em vagina artificial, expondo-se cada animal, individualmente, a uma fêmea bubalina, em estro ou não, inicialmente sem a interferência humana. Dessa forma, com os animais bem condicionados, o processo de coleta por vagina artificial foi realizado de forma tranquila e continuada durante o período do experimento.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em pasto de *Urochloa brizantha* cv Marandu e suplementados na seca com volumoso (silagem de sorgo), concentrado, sal mineral e água *ad libitum*.

4.3 – Coleta de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas por um período total de 12 meses, realizando-se uma tentativa de coleta de sêmen por semana por animal durante todo o período de avaliação com o auxílio de uma vagina artificial aquecida a 42-45°C. Antes da tentativa de coleta de sêmen, uma falsa monta, com ou sem ereção, foi permitida a cada touro. No caso de desinteresse do macho em montar, uma nova tentativa era realizada após ele observar outros touros montando. O sêmen foi acondicionado em tubos graduados previamente aquecidos em estufa a 39°C. Foram utilizadas duas novilhas búfalas e uma fêmea adulta como manequim, todas previamente condicionadas, expostas ao macho, individualmente, somente na hora da coleta. As coletas foram realizadas na parte da manhã, começando às 8:00h em local sombreado.



Figura 2 – Coleta de sêmen realizada através do método da vagina artificial

Considerando que nem todas as tentativas resultaram em sucesso, os dados de características seminais de ejaculados coletados com um intervalo maior do que 10 dias da última coleta, foram descartados para efeito da análise de influência sazonal.

Os dados das características seminais foram agrupados de dois em dois meses e expressos em valores médios por cada período de dois meses. As análises comparativas foram realizadas entre períodos bimestrais, a saber: janeiro e fevereiro, março e abril, maio e junho, julho e agosto, setembro e outubro, novembro e dezembro.

4.4 – Dados climáticos

A temperatura máxima e mínima (°C), precipitação pluviométrica (mm), umidade relativa do ar (%), insolação (horas) e duração da luz (horas) para o presente estudo (2014-2015) foram obtidos da Estação Automática da Pampulha do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada na latitude 19° 88' sul e longitude 43° 97' oeste. A estação se encontra a 35km de distância do local do experimento. A frequência de obtenção destes dados foi diária e as médias foram divididas bimestralmente.

4.5 - Espermograma

Imediatamente após cada coleta, as características macroscópicas do sêmen foram avaliadas por um experiente operador quanto ao volume (mL), aspecto (aquoso, cremoso ou leitoso), odor e cor (branco, amarelo). Após isso, foram realizadas, pelo mesmo operador, as avaliações microscópicas: turbilhonamento ou movimento de massa (0-5), motilidade progressiva (%), vigor (1-5) e concentração espermática (sptz/mL) e foi coletada uma amostra acondicionada em formol-salina para a avaliação e leitura posterior da morfologia espermática (%).

O movimento de massa foi avaliado colocando-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C e levada para leitura em um microscópio óptico com aumento de 100X. A classificação varia de 0 a 5, sendo 0 a ausência de movimento e 5 o movimento de onda intenso (CBRA, 2013).

A motilidade progressiva e o vigor foram medidos em conjunto, colocando-se uma gota de sêmen em uma lâmina, cobrindo-a com uma lamínula (previamente aquecidas a 37°C) e levando ao microscópio óptico para leitura com aumento de 400X (CBRA, 2013). A motilidade foi expressa em porcentagem de espermatozoides móveis enquanto o vigor retratou a força do movimento de cauda e a velocidade do espermatozoide e foi classificado de 1 a 5 sendo o 1 sem movimento progressivo e 5 o movimento vigoroso.

Para a determinação da concentração espermática, uma amostra de sêmen foi diluída em proporção de 1:200 em solução de formol-salina-tamponada e a contagem do número de células realizada na Câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400X (CBRA, 2013).

A avaliação da morfologia espermática foi realizada através da técnica de preparação úmida. Para isso, 50µL de sêmen foi diluído em 1mL de formol-salina-tamponada e armazenada refrigerada para posterior leitura. Para a leitura, foi colocada uma gota do sêmen diluído em uma lâmina, coberta por lamínula e avaliada em microscópio de contraste de fase (Nikon®, modelo E-200) em

aumento de 1000X sob óleo de imersão. Foi realizada a contagem de 100 células, analisando-se a forma e estrutura da cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozoide.

4.6 – Comportamento sexual

A avaliação do comportamento sexual foi realizada através do registro do tempo de reação e dos comportamentos que caracterizassem o interesse sexual do macho frente à fêmea. O tempo de reação foi cronometrado até a ejaculação dando-se a oportunidade de interação por no máximo 10 minutos. Fizeram parte dos comportamentos avaliados: cheirar vulva, lamber vulva, apoiar o queixo na garupa da fêmea, cabeçada na virilha, exposição do pênis, reflexo de Flehmen, monta sem exposição do pênis, monta incompleta.

A avaliação final da libido incorporou os dois métodos de análise: o tempo de reação médio bimestral dos animais e a proporção de cada comportamento sexual.

4.7 – Análise estatística

O experimento foi realizado utilizando-se delineamento em blocos ao acaso, sendo o animal considerado o bloco. Os dados quantitativos: volume espermático, motilidade progressiva, concentração espermática, número total de espermatozoides, espermatozoides morfológicamente normais e tempo de reação foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade, sendo analisados por ANOVA e as diferenças entre as médias comparadas pelo teste de Duncan. As medianas das variáveis qualitativas: motilidade progressiva, movimento de massa e vigor foram analisadas pelo método não paramétrico teste de Friedman e os dados climáticos pelo teste de Kruskal Wallis. Utilizou-se um nível de significância a 5%.

5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Dados climáticos

Os valores médios bimestrais dos dados climáticos: precipitação pluviométrica (mm), temperaturas máxima e mínima (°C), horas de insolação, umidade relativa do ar (%) e horas de luminosidade por dia se encontram divididos de dois em dois meses na Tabela 3. Na Figura 3 está ilustrada a variação anual da duração da luz por dia em horas, todos referentes ao período do presente estudo.

O município de Pedro Leopoldo, localizado em Minas Gerais, possui clima subtropical úmido e se situa na latitude 19° 37' 12" sul e longitude 44° 02' 38" oeste. No período estudado, apresentou 2 momentos distintos, de maio até outubro, o qual foi registrada pouca chuva e temperatura mais baixa, enquanto que de novembro a abril ocorreram muito mais chuvas e temperatura mais alta como é possível ver na Tabela 3. Isso é esperado nesse tipo de clima, ocorrendo um período de chuva e um período de seca bem delimitados.

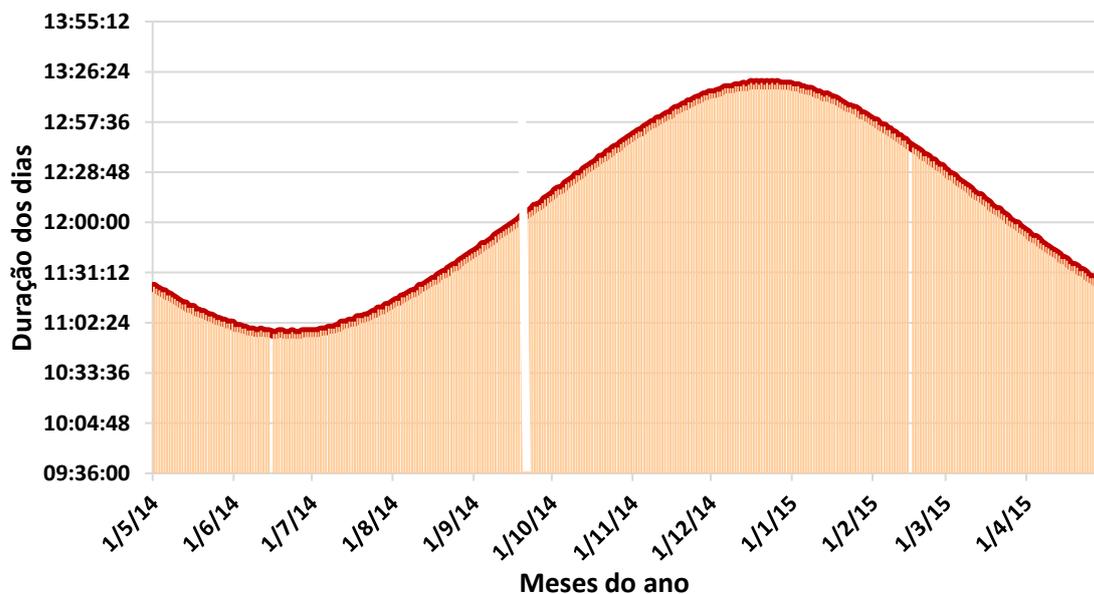
Os animais do presente trabalho foram criados de forma extensiva, com pasto à vontade e, no período de julho a outubro, a qualidade e quantidade disponível de forragem foi menor devido à seca. Devido a isso, foram suplementados com silagem neste período e, desta forma, os animais não tiveram uma perda considerável de peso.

Tabela 3 – Médias bimestrais dos dados climáticos do período de 12 meses dos anos de 2014 e 2015 na latitude 19° 88' sul e longitude 43° 97' oeste.

	Maio/Jun	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev	Mar/Abr
Precipitação pluviométrica (mm)	0,5 b	0,8 b	1,1 b	5,8 a	6,4 a	5,2 a
Temperatura máxima (°C)	25,8° c	25,4° c	29,1° b	28,8° b	30,1° a	28,1° b
Temperatura mínima (°C)	15,8° d	14,7° d	16,9° c	18,4° b	20,8° a	19,9° a
Temperatura média (°C)	20,8° d	20,1° d	23° c	23,6° bc	25,5° b	24° a
Insolação (horas/dia)	7,5 a	7,5 a	7,8 a	6,5 a	7,4 a	5,2 b
Umidade relativa (%)	62,3% b	57,1% c	47,6% d	62% bc	59,6% bc	66,5% a
Horas de luz/dia	11:04	11:15	12:16	13:11	12:58	11:55
ITH	20,06	19,27	21,59	22,48	24,02	23

Letras diferentes na linha indicam diferenças estatística ($p \leq 0,05$)

Com relação às horas de insolação por dia, valores similares ocorreram em todos os meses com exceção de março e abril que apresentaram valores mais baixos ($p \leq 0,05$). O búfalo é um animal que possui alta sensibilidade à exposição direta à luz solar devido à sua pele negra e grossa além de possuir menor densidade de glândulas sudoríparas na pele (Vale, 2007). Vieira (1995), ao estudar os efeitos da insolação solar e das altas temperaturas em novilhas búfalas da raça Mediterrâneo, relatou maiores taxas de temperatura retal, frequência respiratória e sudorese, além de menor consumo de alimento e ganho de peso médio diário no grupo estressado quando comparado ao grupo controle. O mesmo autor chegou à conclusão que os búfalos são consideravelmente sensíveis para os parâmetros fisiológicos em temperaturas acima de 38°C e umidade relativa de 69%. Durante o presente experimento, os animais não foram submetidos a estes limites citados.



Utilizando-se a fórmula proposta por Marai *et al.* (2001), foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITH) para os bimestres e eles se encontram na Tabela 4. De acordo com o proposto por Marai e Haebe (2010), foi considerado estresse térmico moderado quando os valores de ITH apresentaram valores entre 22,3 e 23,2 e, dessa forma, os bimestres novembro e dezembro, março e abril apresentaram essa condição; e estresse térmico severo, entre 23,3 e 25,6, sendo assim, janeiro e fevereiro apresentaram essa conjuntura e poderiam resultar em danos aos bubalinos e, conseqüentemente, influenciar a reprodução deles. O restante dos meses apresentou valores de ITH abaixo de 22,2 e, assim, não houve qualquer estresse térmico aos animais.

Tabela 4 – Médias bimestrais do índice de temperatura e umidade (ITH) na latitude 19° 88' sul e longitude 43° 97' oeste no período de 12 meses do experimento nos anos de 2014 e 2015

	Maio/Junho	Julho/Agosto	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev	Março/Abril
ITH	20,06	19,27	21,59	22,48	24,02	23

ITH: índice de temperatura e umidade segundo fórmula proposta por Marai *et al.* (2001)

5.2 – Análise do sêmen

As coletas foram realizadas no período de maio de 2014 a abril de 2015, totalizando 12 meses, e o total de ejaculados coletados foi de 446 em 477 tentativas (93,5%). A distribuição dos ejaculados de acordo com os meses do ano está na Tabela 5. Ejaculados com intervalo maior do que dez dias não foram considerados na avaliação.

Tabela 5 – Distribuição dos ejaculados (coletas com sucesso/tentativas realizadas) de acordo com os meses do ano

	Touros									Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Idade (meses)	38	37	36	38	35	45	28	28	28	
Nº de ejaculados totais/ano	53	52	53	53	42	38	51	53	51	446/476(93,5%)
Ejaculados por mês										
Maio e junho	9/9	9/9	9/9	9/9	7/9	7/9	9/9	9/9	9/9	77/81 (95,1%)
Julho e agosto	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	8/9	9/9	9/9	9/9	80/81 (98,8%)
Setembro e outubro	9/9	9/9	9/9	9/9	8/9	8/9	9/9	9/9	9/9	79/81 (97,5%)
Novembro e dezembro	9/9	9/9	9/9	9/9	4/9	4/9	7/9	9/9	7/9	67/81 (82,7%)
Janeiro e fevereiro	8/8	8/8	8/8	8/8	7/8	6/8	8/8	8/8	8/8	69/72 (95,8%)
Março e abril	9/9	8/8	9/9	9/9	7/9	5/9	9/9	9/9	9/9	74/80 (92,5%)

Dos 446 ejaculados coletados, 343 apresentaram aspecto leitoso (76,9%), 85 aquosos (19,06%) e apenas 18 cremosos (4,04%). Essa característica é esperada uma vez que o sêmen do bubalino não é muito concentrado como está descrito na Tabela 2, variando a concentração de 300 a 1200 x 10⁶/mL. Foi relatado por Javed *et al.* (2000) um maior número de ejaculados leitosos. Contrariamente, Dixit *et al.* (1984) relataram mais de 80% dos ejaculados cremosos em seu trabalho e Koonjaenak *et al.* (2007a) descreveram um equilíbrio, havendo 47,5% dos ejaculados leitosos e 50% cremosos em seu trabalho. Por ser uma avaliação subjetiva, pode ter ocorrido entre

as equipes de trabalho diferentes padrões para a classificação desses aspectos, o que gerou essa diferença nos resultados.

O presente experimento visou avaliar a influência da sazonalidade nas características seminais de machos bubalinos criados na latitude e longitude do experimento. A meta é orientar técnicos e médicos veterinários quanto ao trabalho com reprodutores machos desta espécie no clima da região e nesta latitude, principalmente para a criopreservação de sêmen. Na literatura consultada os resultados são bastante conflitantes, havendo trabalhos com resultados divergentes nas mais diversas latitudes.

A média das características dos ejaculados de cada animal e a média geral de todos os animais durante o ano do experimento estão descritos na Tabela 6 e estão de acordo com os referidos por Vale *et al.* (2008) e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), que estão apresentados na Tabela 2, exceto o movimento de massa ou turbilhonamento. A média encontrada de 2,3 está abaixo do reportado por Vale *et al.* (2008) como padrão de normalidade, que seria acima de 3. Essa é uma característica que por ser subjetiva pode gerar essas diferenças, mesmo tendo sido avaliada por um experiente e qualificado avaliador. Além disso, ela é o resultado da soma da concentração com a motilidade e o vigor espermático e esses parâmetros se encontraram dentro dos parâmetros espermáticos referidos. Portanto, esse valor de movimento de massa abaixo do esperado deve ser relevado ou não considerado com muita importância. Apesar disso, resultados similares para essa característica seminal foram reportados por Bhakat *et al.* (2015), que encontraram 2,54 de média no ano.

Tabela 6. Valores médios anuais das características seminais de búfalos coletados semanalmente durante um ano

Touros	Volume (mL)	Motilidade (%)	Mov. de massa (0-5)	Vigor (1-5)	Concentração (x10⁶/mL)	Número total de espermatozoides x10⁶	Normais (%)
1	2,2 ± 1,1	87 ± 14,5	1,9 ± 1,1	4,1 ± 0,9	832,6 ± 543,3	1820,2 ± 1590,8	90,5 ± 6
2	1,6 ± 0,7	84,5 ± 8,1	2,9 ± 1	4,1 ± 0,7	1607,2 ± 1150,4	2523,2 ± 1983,4	89,6 ± 3,2
3	2,5 ± 1,3	76,3 ± 15,2	2,3 ± 1,3	4,2 ± 0,7	1533,9 ± 864,1	3747,3 ± 2855,8	92,7 ± 3,7
4	2,3 ± 1,2	80 ± 12,2	2,5 ± 1	3,8 ± 0,7	1019 ± 556,8	2444,8 ± 2076,8	89,6 ± 4,2
5	2 ± 0,9	83,8 ± 9	2,3 ± 1,3	4,4 ± 0,8	1107,1 ± 1014,9	2506,1 ± 3207,4	92,7 ± 2,9
6	1,6 ± 0,9	87,9 ± 6,7	2,4 ± 1	4,4 ± 0,7	976,4 ± 524,4	1740,7 ± 1811,4	90,9 ± 3,3
7	3 ± 1,3	72,4 ± 22,8	1,7 ± 1	3,7 ± 0,8	1069,8 ± 744,2	3546,6 ± 3598,3	91,5 ± 4,7
8	2,4 ± 1	79 ± 13,8	1,8 ± 0,9	3,9 ± 0,7	697,7 ± 372,9	1730,8 ± 1225,2	86,7 ± 5,2
9	2,2 ± 1,2	74,1 ± 18,4	2,6 ± 1,3	3,9 ± 0,8	1393,3 ± 687,2	3253,9 ± 2558,4	90,3 ± 4,5
Média geral	2,2 ± 1,2	80,6 ± 15,4	2,3 ± 1,2	4,1 ± 0,8	1144 ± 805,6	2626,9 ± 2503,7	90,4 ± 4,7

Média ± desvio padrão. Mov. de massa: turbilhonamento. Normais: espermatozoides morfolologicamente normais

Na Tabela 6, também é possível observar algumas características seminais dos animais. As médias de volume variaram entre 1,6 e 3mL, a motilidade foi de 72,4% a 87,9%, a concentração variou de 697,7 a 1607,2 x 10⁶/mL e o número total de espermatozoides de 1730,8 a 3747,3 x 10⁶. Assim,

é possível notar que houve uma grande variação na qualidade seminal entre os animais, havendo um grande efeito individual, como relatado em touros da raça Mediterrâneo por Di Francesco (2010) e variação entre ejaculados de um mesmo animal. A ordem de coleta dos animais durante o ano variou, não havendo uma mesma ordem sempre, porém, não foi notado diferença quando o animal era um dos primeiros ou um dos últimos, logo, a hipótese de um maior estímulo sexual, ao observar outros machos montando, explicar essas variações, foi negada.

Com relação à morfologia espermática, os ejaculados apresentaram valores superiores a 86% de espermatozoides morfologicamente normais e a média de todos os animais no ano foi de $90,4 \pm 4,7\%$, não podendo ser esta a razão de qualquer variação na motilidade ou no número total de espermatozoides por ejaculado. Assim, não foi notado nenhum período que pudesse sugerir um estado de degeneração testicular em todos os machos e, dessa forma, estar associado a uma variação em algum parâmetro do ejaculado.

5.2.1 – Avaliação da sazonalidade na qualidade seminal

Durante o ano, as médias bimestrais de volume espermático (mL), turbilhonamento ou movimento de massa (0-5), motilidade espermática (%), concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) e número total de espermatozoides ($\times 10^6$), de todos os animais, não sofreram variação e estão demonstrados nas Figuras 4, 6, 7, 8 e 9, respectivamente. Já as variáveis vigor (1-5) e morfologia espermática (%) apresentaram diferença significativa entre os meses estudados (Figura 5 e Figura 10).

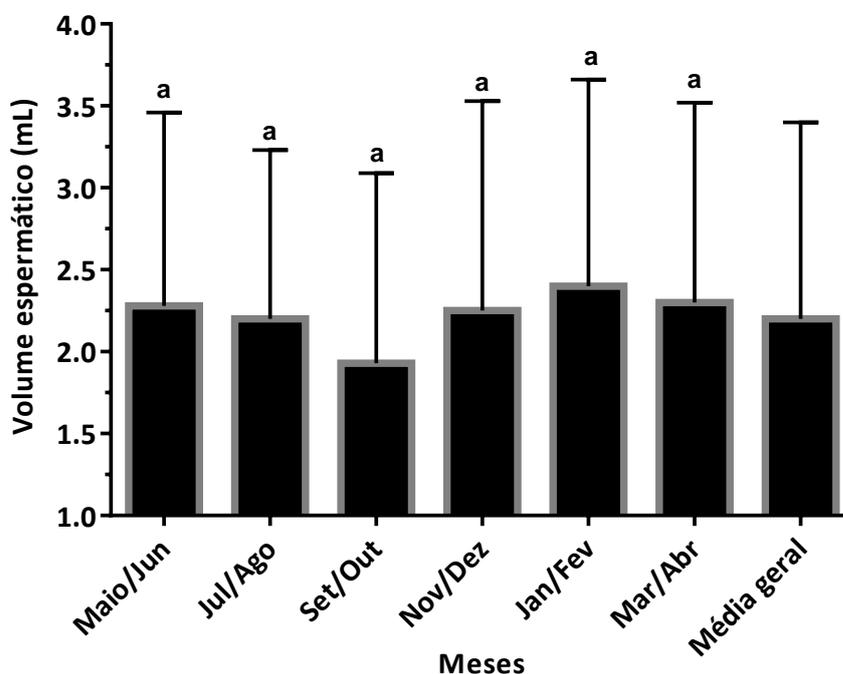


Figura 4. Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) de todos os touros no período de 12 meses ($n = 9$). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$).

O volume espermático (mL) apresentou, respectivamente, os seguintes valores médios com seus respectivos desvios padrões para os meses de maio e junho, julho e agosto, setembro e outubro, novembro e dezembro, janeiro e fevereiro, março e abril: $2,3 \pm 1,2$; $2,2 \pm 1$; $1,9 \pm 1,2$; $2,2 \pm 1,3$; $2,4 \pm 1,3$ e $2,3 \pm 1,2$. Não foi encontrada diferença significativa entre os meses (Figura 4). Esse resultado tanto confirma o relato de alguns autores em búfalo do pântano (Koonjaenak *et al.*, 2007a) e búfalo do rio (Heuer *et al.*, 1987; Bahga & Khokar, 1991; Khan *et al.*, 1997; Tiwari *et al.*, 2011; Bhakat *et al.*, 2015) quanto contradiz outros autores, que relataram maior volume espermático nas mais variadas estações: Sharma *et al.* (2015) no verão; El Sawaf *et al.* (1971) e Javed *et al.* (2000) no outono; Ferrer *et al.* (2010) na primavera; Mayahi *et al.* (2014) no inverno.

O vigor (1-5) apresentou diferenças significativas durante o ano (Figura 5). Os bimestres setembro e outubro, janeiro e fevereiro ($4,4 \pm 0,3$ e $4,3 \pm 0,4$, respectivamente) foram similares aos meses julho e agosto ($4,3 \pm 0,3$) e superiores ao restante do ano ($p \leq 0,05$). Os valores médios encontrados para os meses de maio e junho, novembro e dezembro, março e abril foram, respectivamente, $3,6 \pm 0,3$; $3,7 \pm 0,6$ e $3,8 \pm 0,4$.

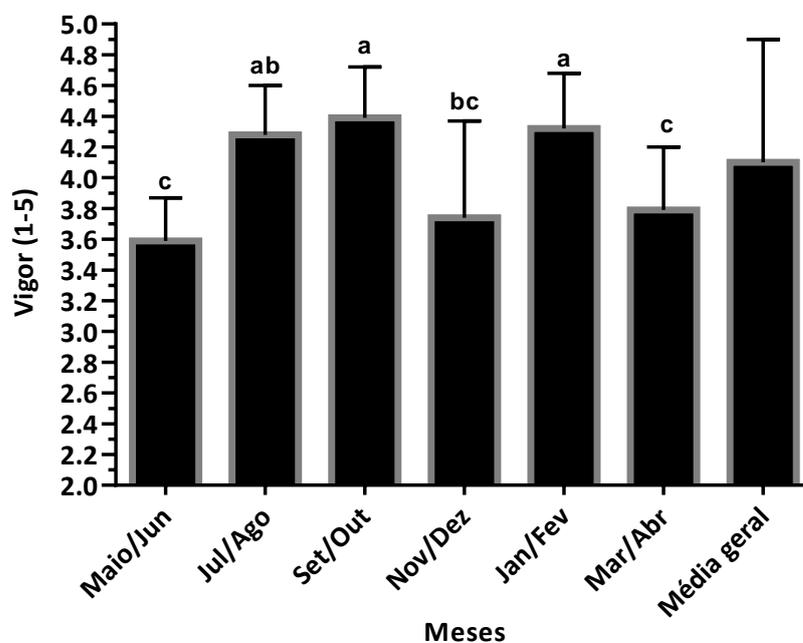


Figura 5. Médias e desvio padrão bimestrais do vigor espermático (1-5) dos touros no período de 12 meses (n = 9). Letras diferentes indicam diferença estatística nos bimestres ($p \leq 0,05$).

O turbilhonamento (0-5) não apresentou diferenças significativas durante o ano ($p \geq 0,05$), mostrando menores valores para o bimestre maio e junho, com 1,9 de média (Figura 6). Esse valor coincide com os menores valores obtidos para concentração espermática, o que é esperado uma vez que o turbilhonamento está diretamente ligado à concentração.

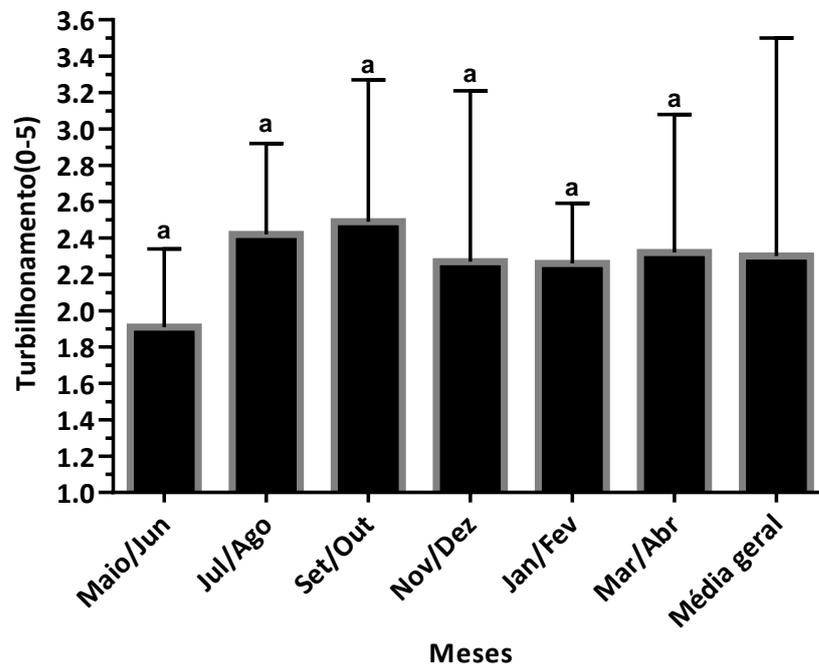


Figura 6. Médias e desvio padrão bimestrais do turbilhonamento (0-5) dos touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$).

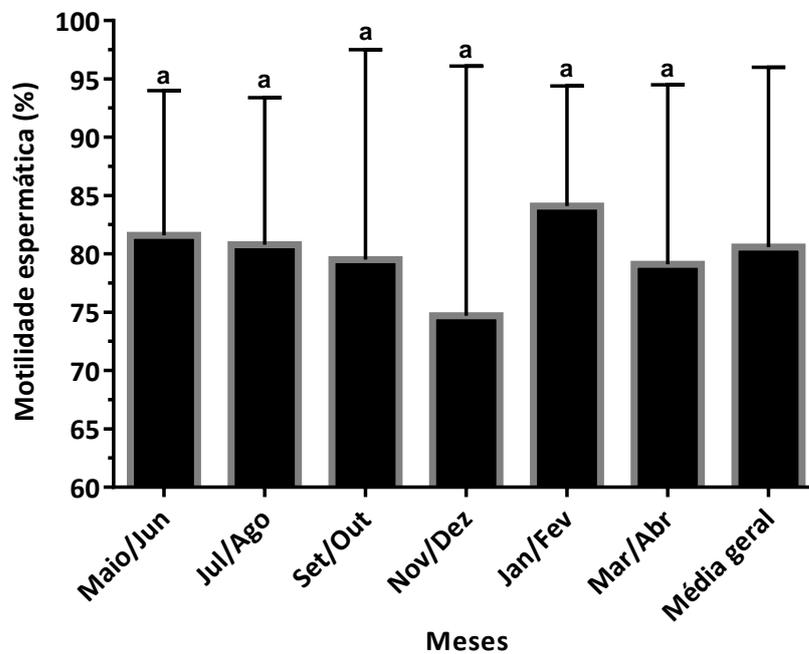


Figura 7. Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) dos touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$).

A motilidade espermática é mais um parâmetro que não apresentou diferença significativa entre os meses, obtendo valores menores nos meses de novembro e dezembro. As médias dessa característica no ano foram: $81,6 \pm 12,4$; $80,8 \pm 12,6$; $79,5 \pm 18$; $74,7 \pm 21,4$; $84,1 \pm 10,3$ e $79,1 \pm 15,4$ para os seguintes meses, respectivamente, maio e junho, julho e agosto, setembro e outubro, novembro e dezembro, janeiro e fevereiro, março e abril (Figura 7). Resultados similares em que não foi encontrado diferença estatística durante o ano foram relatados por Ferrer *et al.* (2010), apresentando média de 75,3% no ano e, diferentemente, maiores valores no inverno de 84,09% contra 78,98% no verão (Mayahi *et al.*, 2014) e 65,95% contra 56,18% no verão (Bhakat *et al.*, 2015) foram relatados.

A concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) não apresentou diferença significativa entre os meses e menores valores foram obtidos nos meses de maio e junho, $934,1 \pm 537,2$; enquanto janeiro e fevereiro apresentou a maior média com $1326,1 \pm 1247,6$. Os meses de julho e agosto, setembro e outubro, novembro e dezembro, março e abril apresentaram as seguintes médias, respectivamente: $1170,7 \pm 783,4$; $1291,2 \pm 813,9$; $1112,1 \pm 728,9$ e $1074,1 \pm 566,1$ (Figura 8). Esses resultados indicam que diferenças climáticas e no fotoperíodo não influenciam na produção testicular da espécie bubalina. Alguns autores também relataram não haver diferença significativa entre os meses (Bahga & Khokar, 1991; Koonjaenak *et al.*, 2007a; Di Francesco, 2010; Ferrer *et al.*, 2010) enquanto que diferenças também foram encontradas, ocorrendo maiores valores no verão (Heuer *et al.*, 1987; Sharma *et al.*, 2015), no outono (Elsawaf *et al.*, 1971; Khan *et al.*, 1997) e no inverno (Mayahi *et al.*, 2014; Bhakat *et al.*, 2015).

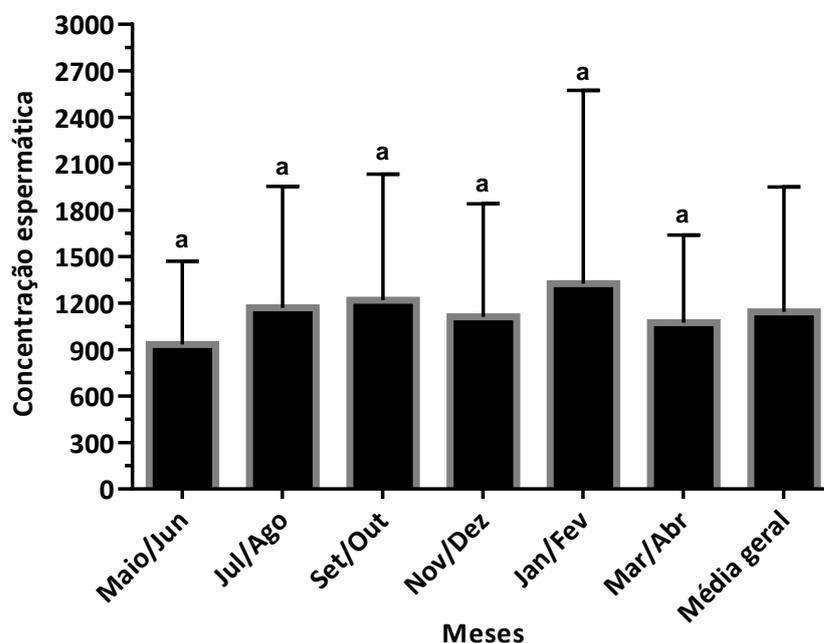


Figura 8. Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) de todos os touros no período de um ano ($n = 9$). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$).

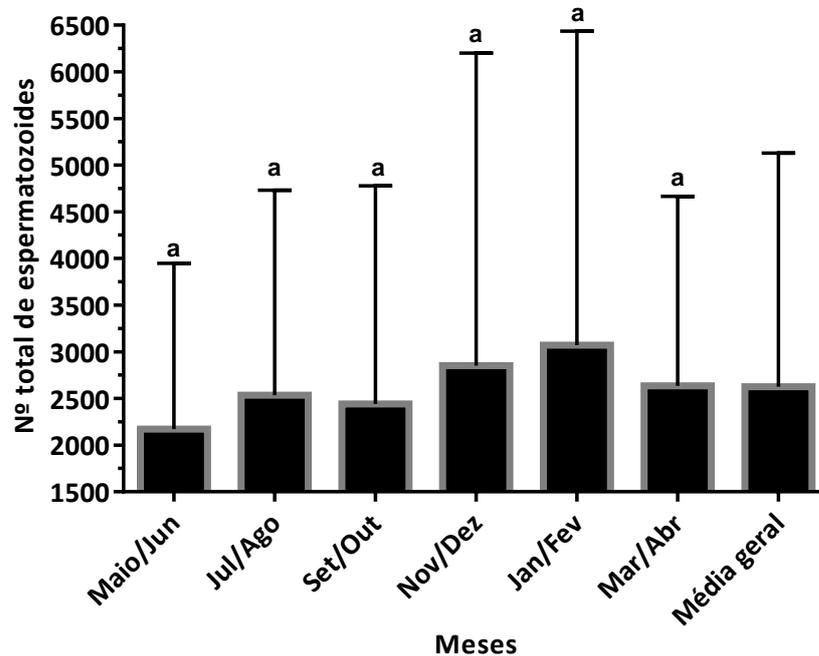


Figura 9. Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) de todos os touros no período de 12 meses ($n = 9$). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$).

Diretamente correlacionado ao volume e à concentração espermática, está o número total de espermatozoides ($\times 10^6$) o qual não diferiu entre os meses e, assim como na concentração, a média mais alta foi registrada nos meses de janeiro e fevereiro, $3072,3 \pm 3362,9$. Os valores para o restante do ano foram: maio e junho, $2172,4 \pm 1776,9$; julho e agosto, $2535,6 \pm 2194,8$; setembro e outubro, $2442,3 \pm 2335,2$; novembro e dezembro, $2851,6 \pm 3350,7$ e março e abril, $2636,1 \pm 2028,1$ (Figura 9).

O local de realização deste trabalho possui como coordenada a latitude 19° sul e trabalhos realizados no hemisfério sul avaliando a sazonalidade reprodutiva em machos bubalinos são escassos, podendo-se citar Brown *et al.* (1991) na África do Sul, latitude 23° sul e Castro *et al.* (1994) em São Paulo – Brasil, latitude 22° sul. O primeiro trabalho citado foi realizado em búfalos africanos (*Syncerus caffer*), utilizou como método de coleta o eletroejaculador, diferentemente do presente experimento, e apresentou como resultado um sêmen de melhor qualidade na estação reprodutiva da espécie (abril e maio) quando comparado com outubro e novembro. Já o segundo, utilizando-se a vagina artificial apresentou apenas um volume espermático menor no verão. Além disso, no Hemisfério Norte foram poucos os trabalhos encontrados na literatura com latitudes próximas como: Bhosrekar *et al.* (1991), na latitude 18° norte, que avaliaram apenas a congelabilidade do sêmen; Koonjaenak *et al.* (2007a), na latitude 16° norte, que não encontraram qualquer diferença nas características seminais durante o ano; e Ferrer *et al.* (2010), na latitude 23° norte, que relataram apenas um volume espermático menor na primavera. Todos elegeram a vagina artificial como método de coleta.

Dessa forma, apenas trabalhos conduzidos em búfalos do pântano na latitude 16° norte (Koonjaenak *et al.*, 2007a) e búfalos do rio na latitude 30° norte (Bahga & Khokar, 1991)

obtiveram os mesmos resultados do presente trabalho, não apresentando diferença em qualquer das características físicas estudadas. O vigor não foi avaliado nesses trabalhos. Os diferentes resultados relatados em trabalhos conduzidos nas mais diversas latitudes poderiam ser explicados por diferentes condições de manejo, idade dos animais ou mesmo condições geoclimáticas.

Outra importante forma de avaliação do sêmen é através da morfologia espermática uma vez que, através deste exame, são avaliadas a espermatogênese, a maturação espermática e a atividade das glândulas sexuais acessórias (Koonjaenak, 2006). Com relação à morfologia espermática, diferenças significativas foram encontradas e o bimestre setembro e outubro ($87 \pm 3,4$) apresentou porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais similar estatisticamente à novembro e dezembro ($89 \pm 2,7$) e menor que os demais meses ($p \leq 0,05$). Os demais meses maio e junho, julho e agosto, janeiro e fevereiro, março e abril, obtiveram, respectivamente, $92 \pm 1,7$; $91 \pm 2,5$; $91 \pm 2,5$ e $92 \pm 1,8$ (Figura 10). Esse aumento de anormalidades nos dois bimestres citados está diretamente ligado a um aumento do número de defeitos de cabeça, principalmente, formas teratológicas, como é possível ver na Tabela 7, e isso poderia ser bastante deletério caso estivesse em grande número uma vez que esse tipo de defeito pode afetar severamente a fertilidade do touro (Wenkoff, 1988 citado por Arruda *et al.*, 2015). Como o número de espermatozoides normais ainda continuou bem acima do estabelecido por Vale *et al.* (2008), ou seja, maior ou igual a 70%, esse aumento de defeitos não teria afetado a fertilidades dos animais. Esses resultados contrariam os encontrados por Di Francesco (2010) que encontrou maior número de espermatozoides normais na primavera (69,6%) e também os achados por Ferrer *et al.* (2010) que relataram menor número de espermatozoides normais no verão (66,2%).

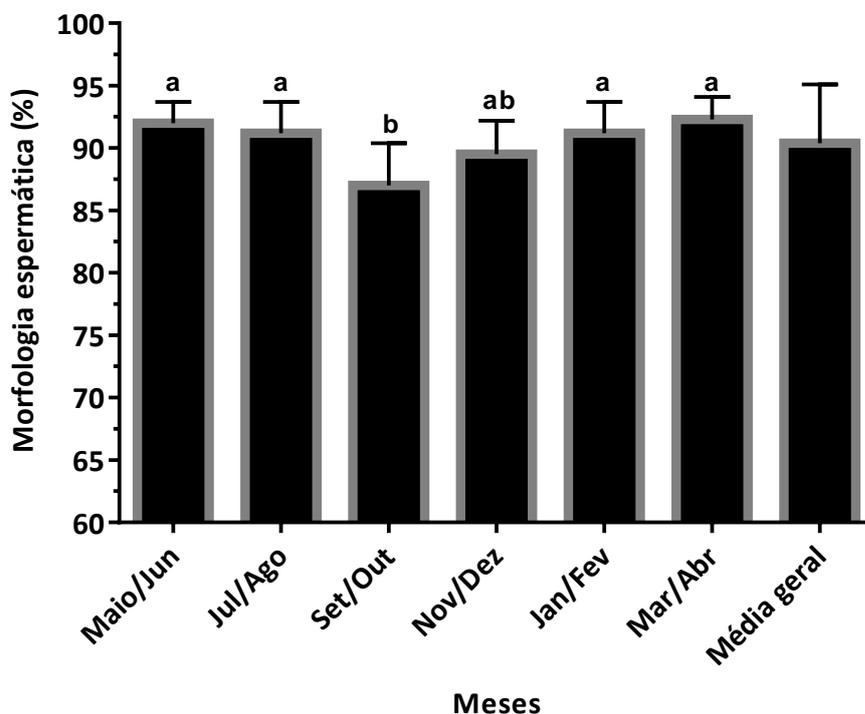


Figura 10. Médias e desvio padrão bimestrais do número de espermatozoides morfologicamente normais (%) de todos os touros no período de 12 meses ($n = 9$). Letras diferentes indicam diferença estatística nos bimestres ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Média bimestral da porcentagem dos defeitos de cada porção do espermatozoide

	Cabeça (%)	PI (%)	Cauda (%)
Mai e junho	2,3	2,9	2,8
Julho e agosto	2,1	3,6	3,1
Setembro e outubro	5,7	3,9	3,4
Novembro e dezembro	4,1	3,2	3,2
Janeiro e fevereiro	2,9	3,3	2,6
Março e abril	2,4	2,8	2,5

Cabeça: defeitos de cabeça; PI: defeitos de peça intermediária; Cauda: defeitos de cauda.

Nenhuma das características espermáticas avaliadas sofreu quaisquer alterações sazonais que pudessem sugerir um efeito deletério à fertilidade de touros Murrah criados em região de clima subtropical úmido. Dessa forma, pode-se inferir que o manejo reprodutivo de búfalos Murrah é possível durante o ano todo sem qualquer prejuízo à fertilidade.

5.3 – Comportamento sexual

5.3.1 – Coletas de sêmen

Os animais, devido ao condicionamento à coleta de sêmen utilizando-se o método da vagina artificial desde os 25 meses de idade, não demonstraram qualquer rejeição ao método usado durante todo o período experimental, mesmo não se utilizando em momento algum uma fêmea em estro. Das 476 tentativas de coleta no período de 12 meses do presente trabalho, 446 (93,7%) foram realizadas com sucesso, com o animal chegando à ejaculação. Como é possível ver na Tabela 5, todos os animais, exceto os animais 5 e 6, apresentaram taxas de sucesso na coleta superiores a 96% (51 coletas em 53 tentativas), sendo que cinco deles (animais 1, 2, 3, 4 e 8) não falharam nenhuma vez. Os animais 5 e 6 que apresentaram, respectivamente, 42 e 38 coletas em 53 tentativas (79,24% e 71,7%, respectivamente), apesar de terem falhado mais nos meses de novembro e dezembro, tendo realizado quatro coletas em nove tentativas (44,44%), mostraram insucesso nas tentativas de coleta em outros meses do ano não caracterizando, portanto, ser o insucesso ligado a um efeito do fotoperíodo ou climático. Em período similar (março a junho que correspondem a setembro a dezembro no Hemisfério Sul), Dixit *et al.* (1984) em trabalho conduzido na Índia, relatou maiores porcentagens de recusa à monta (34%) e, conseqüentemente, ejaculação.

Pode-se especular algumas razões para a recusa à ejaculação desses animais. A primeira seria a rejeição da fêmea pelo macho. Em certos períodos, devido ao insucesso na coleta de sêmen em alguns machos, foi testado substituir a fêmea e apesar de apresentar um resultado positivo inicial em ambos animais, depois eles voltaram, após duas semanas em um momento e quatro semanas em outro, a não executarem a monta. É válido salientar que o animal 6, além de um pouco mais velho que os outros, foi o único a ser usado em monta natural em duas estações de monta anteriores e, por isso, fica aberta a possibilidade de que a experiência adquirida em detectar o momento de estro nas vacas tenha afetado o sucesso de coleta de sêmen usando como manequim uma búfala fora do estro. Outra possibilidade de causa de insucesso seria o calor excessivo, no entanto as tentativas de coleta sempre foram realizadas no período da manhã em local sombreado e o pico de temperatura nunca ultrapassou 30°C, o que não interferiu na coleta da maioria dos

touros. Na tentativa de analisar se o insucesso na coleta destes touros estava ligado a temperatura foram realizadas tentativas de coletas à noite e, mesmo assim, estes dois machos continuaram a não montar e ejacular. Por último, outra hipótese levantada foram períodos de maior disputa entre touros e que esta disputa levaria à não execução da monta, seja por cansaço dos animais ou outra razão. No entanto, a separação dos machos na noite anterior à coleta não resultou em benefício aparente. Dessa forma, não foi possível identificar uma causa específica para o insucesso, mais parece ser uma soma de fatores ou até mesmo uma característica específica destes machos.

É descrito na literatura que alguns bubalinos sob regime de coleta de sêmen continuada podem perder a libido e, inesperadamente, deixar de montar por longos ou curtos períodos (Prabhu & Bhattacharya, 1954). De qualquer forma, com os poucos insucessos na coleta de sêmen, considerando que boa parte dos machos executaram a monta e ejacularam na vagina artificial na maioria das tentativas, se não em todas, permite-se reduzir o efeito da sazonalidade sobre o interesse sexual e sobre o sucesso da coleta de sêmen pelo método da vagina artificial. É importante ressaltar que apenas um dos nove machos tinha experiência sexual em regime de monta natural a campo, deixando aberto para ser comprovado se touros com maior experiência sexual a campo também manteriam este condicionamento na maioria dos meses do ano.

O cortejo sexual dos búfalos, apesar de se assemelhar ao de bovinos (*Bos taurus e Bos indicus*), é menos intenso e pode ser afetado por altas temperaturas ou mesmo quaisquer fatores que mudem a rotina desses animais, como barulhos estranhos e pessoas diferentes no momento da coleta. Quando o calor é intenso, é comum os búfalos se sentirem desinteressados à monta, mesmo quando colocados frente à uma fêmea no cio (Vale *et al.*, 2008). Devido a isso, no presente trabalho, além de um condicionamento prévio de todos os animais à coleta utilizando-se o método da vagina artificial, foi preconizado que elas fossem feitas na parte da manhã, começando por volta de 8:00 horas e, com o intuito de evitar distrações, com a mesma equipe de trabalho durante todo o ano. Quando houvessem pessoas novas ou diferentes, era evitado que elas ficassem próximas da área onde eram realizadas as coletas até os animais se acostumarem com elas. Apesar disso, nas poucas vezes que poderia existir algum tipo de distração, os animais foram coletados da mesma forma, demonstrando que com um condicionamento correto, fatores externos não atrapalham essa espécie. Dessa forma, não houveram muitos problemas nas coletas e apenas dois animais falharam em ejacular durante o ano, apresentando 42/53 (79,3%) e 38/53 (71,7%) coletas/tentativas respectivamente.

5.3.2 – Avaliação do comportamento sexual

O comportamento sexual dos animais foi avaliado através do tempo que o animal demora desde a apresentação à fêmea até a monta completa (tempo de reação) e da anotação dos diferentes comportamentos durante as tentativas de coleta. A média do tempo de reação e da porcentagem de cada comportamento de cada animal durante o ano, se encontram descritas na Tabela 8. As médias bimestrais do tempo de reação de todos os animais estão na Figura 11 e não apresentaram diferença significativa entre os meses ($p \geq 0,05$). A distribuição da porcentagem dos comportamentos de todos os animais durante o ano dividido bimestralmente se encontra ilustrada na Figura 12. O período máximo de avaliação foi de 10 minutos para cada touro.

O tempo de reação apresentou média no ano de $113,2 \pm 72,7$ segundos e não foram registradas diferenças significativas durante o ano (Figura 11). Dixit *et al.* (1984) também não relatou diferenças significativas durante o ano enquanto Elsawaf *et al.* (1971), ao avaliar o interesse

sexual de machos bubalinos com idades entre 3,5 e 4,5 anos, encontrou maior atividade sexual na primavera e menor no outono.

Tabela 8 – Média \pm desvio padrão dos tempos de reação (s) e proporções médias dos comportamentos sexuais (%) de cada animal durante todo o período estudado

Touros										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média total
Tempo de reação (s)	88,6 \pm 38,8	61,3 \pm 19,8	155,6 \pm 108,7	59,6 \pm 35,7	189 \pm 56,8	189,9 \pm 65,1	105,5 \pm 42,1	74,1 \pm 33,7	95,4 \pm 50,7	113,2 \pm 72,7
Comportamentos										
Cheirar a vulva	30,2%	29,6%	28,7%	31,9%	25,9%	30,6%	24,4%	31,1%	28,3%	29%
Lamber a vulva	10,3%	6,7%	11,4%	9,5%	11,9%	11,1%	10,8%	7,4%	11,1%	10%
Reflexo de Flehmen	25,7%	21,7%	35,7%	22,7%	31,2%	33,2%	16,3%	23,3%	25,2%	26,1%
Apoiar o Queixo	2,6%	2,5%	3,7%	7,7%	6,5%	8,2%	10,6%	1,3%	6,1%	5,4%
Cabeçada	1,9%	1,2%	5,6%	2,2%	9,3%	4,8%	7,2%	2%	2,2%	4%
Exposição do pênis	4,5%	7,9%	3,9%	7,3%	3,2%	3%	9%	12,9%	5,8%	6,4%
Monta s/ exposição	12,3%	7,1%	3,7%	7%	5,4%	2,2%	9%	11,2%	12,2%	7,9%
Monta incompleta	12,5%	23,3%	7,3%	11,7%	6,6%	6,9%	12,7%	10,8%	9,1%	11,2%

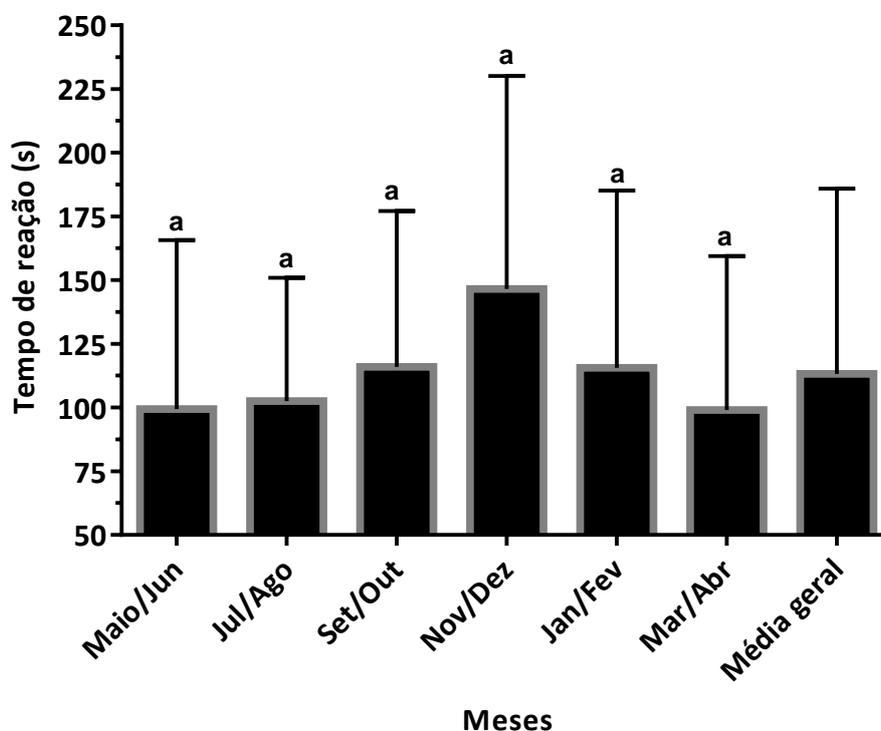


Figura 11. Médias e desvio padrão bimestrais do tempo de reação em segundos de todos os touros no período de 12 meses (n = 9). Letras iguais indicam resultados similares estatisticamente ($p \geq 0,05$).

Além do tempo de reação, também foram anotados os diferentes comportamentos sexuais apresentados pelos animais no momento da coleta. Dentre os comportamentos, os mais realizados no ano foram cheirar a vulva e o reflexo de Flehmen com proporções médias de, respectivamente 29% e 26,1%, seguidos de monta incompleta (11,2%) e lamber a vulva (10%) (Tabela 8). Os dois primeiros comportamentos citados, normalmente, eram realizados em conjunto, assim que o animal era apresentado à manequim, sendo os primeiros registrados. Os atos de cheirar e lamber a vulva e o reflexo de Flehmen são realizados para a identificação da fêmea em estro (Oliveira *et al.*, 2007) e são importantes para a ativação do comportamento sexual do animal uma vez que os feromônios secretados pela fêmea são captados pelo órgão vomeronasal e, através do reflexo de Flehmen, levados através de estímulos elétricos até o hipotálamo, influenciando na liberação de GnRH (Ottoni *et al.*, 2015).

Os atos de cheirar a vulva e o reflexo de Flehmen se mantiveram em todos os bimestres como os comportamentos mais realizados, mantendo sempre uma porcentagem acima de 25%. Já lamber a vulva apresentou um aumento considerável nos bimestres janeiro e fevereiro e março e abril, apresentando 17% e 15,5%, respectivamente. No restante dos meses esses valores não superaram 10% (Figura 12).

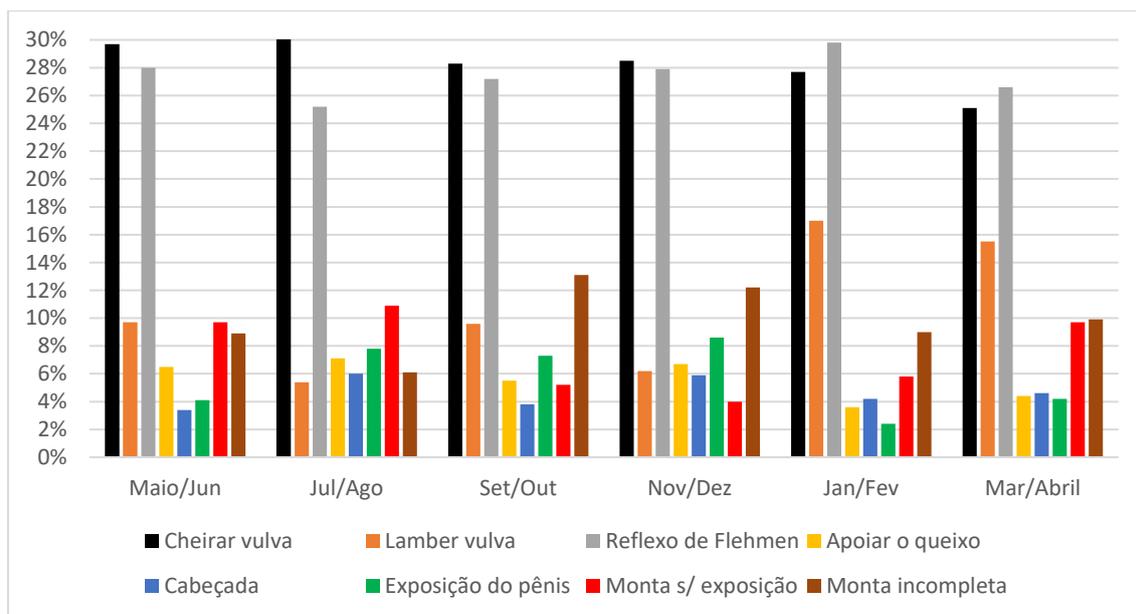


Figura 12. Proporção média bimestral (%) dos comportamentos sexuais observados de todos os animais no período pré-coleta (n = 9).

Como já citado anteriormente, a monta incompleta, ou seja, que o animal expôs o pênis, mas não chegou a ejacular, foi o terceiro comportamento mais realizado (11,2%) e, juntamente com a monta sem exposição do pênis (7,9%) eram realizadas antes da monta completa, ao menos uma vez (Tabela 8). Esses dois comportamentos são realizados pelo touro para testar a receptividade da fêmea, esperando que ela fique quieta para a realização da cópula e foi relatado por Hafs *et al.* (1962) que a qualidade do sêmen tem uma melhora após uma, duas ou três falsas montas, ocorrendo um maior volume do ejaculado, concentração maior e maior porcentagem de motilidade espermática.

Com relação à variação entre os meses, os bimestres maio e junho, julho e agosto, março e abril apresentaram para o comportamento de monta sem exposição, respectivamente, 9,7%; 10,9% e 9,7% e foram os meses com maiores valores, enquanto o restante do ano não passou de 5,8%. Já a monta incompleta não variou muito durante o ano apresentando apenas o bimestre de julho e agosto com uma porcentagem inferior ao restante com 6,1% enquanto que setembro e outubro apresentou um pico de 13,1% e o restante dos meses não apresentou valores inferiores a 8,9% (maio e junho) (Figura 12).

Os atos de apoiar o queixo e expor o pênis, na maioria das vezes, foram realizados, isoladamente ou em conjunto, pouco antes do animal montar, seja para uma monta completa, incompleta ou sem expor o pênis (essa última, o animal retraía o pênis novamente para dentro do óstio prepucial na hora do salto) e não foram de grande importância, apresentando apenas, respectivamente, 5,4% e 6,4% no ano (Tabela 8) e sem muitas variações no ano com os meses de janeiro e fevereiro apontando a menor média, 2,4% (Figura 12).

Os resultados acerca do comportamento sexual de búfalos durante o ano do presente trabalho vão de encontro aos encontrados por Samo *et al.* (2005) em estudo realizado em búfalos da raça Kundhi. Os autores relataram altas porcentagens dos comportamentos de cheirar e lambe a vulva, reflexo de Flehmen e coçar a cabeça na fêmea. Ao contrário, os autores relataram alta porcentagem de apoio de queixo na garupa da fêmea.

Foi observado, também, comportamento homossexual e sodomia entre os animais do experimento enquanto aguardavam no curral de espera. Segundo Phillips (2002), esse tipo de comportamento está muito mais relacionado a uma dominação social do que a um estímulo sexual, porém, no presente trabalho, apesar dele ser realizado muito mais por dois dos animais, na maioria das vezes esse comportamento foi realizado após a coleta e, por isso, é provável que tenha um forte envolvimento sexual nesse tipo de conduta.

6 – CONCLUSÕES

Búfalos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) criados em região de clima subtropical úmido (latitude 19° 37' 12" sul e longitude 44° 02' 38" oeste) não apresentaram mudanças nas características seminais e no comportamento sexual decorrentes de variação sazonal pelo fotoperiodismo, temperatura ambiente e umidade relativa do ar quando criados em boas condições de manejo e alimentação, com áreas de sombreamento e água à vontade. Portanto, o manejo reprodutivo de touros búfalos da raça Murrah é possível durante o ano todo sem qualquer prejuízo à sua fertilidade.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, Z.; HARITH, M. A. Laser spectrochemical characterization of semen. *Talanta*, v. 99, p. 140-145, 2012.

ARAMBEPOLA, N. K.; BUNICK, D.; COOKE, P.S. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate müllerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat sertoli cells. *The Endocrine Society*, v. 139, n. 11, p. 4489-4495, 1998.

- ARRIGHI, S.; DOMENEGHINI, C. Localization of regulatory peptides in the male urogenital apparatus of domestic equidae: a comparative immunohistochemical study in *Equus caballus* and *Equus asinus*. *Histol Histopathol*, v. 12, p. 297-310, 1997.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.
- AVALLONE, L.; PARMEGGIANI, A.; ESPOSITO, L. et al. Correlation between prolactin, T3 and T4 levels in buffalo heifers during the whole year. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo, 1994, p. 477-479.
- BACCARI JUNIOR, F.; POLASTRE, R.; FRÉ, C. A. et al. Um novo índice de tolerância ao calor para bubalinos. Correlação com ganho de peso. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 23, 1986. Campo Grande. Anais da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Campo Grande, 1986, p. 274.
- BAHGA, C. S.; GANGWAR, P. C. Seasonal variations in plasma hormones and reproductive efficiency in early postpartum buffalo. *Theriogenology*, v. 30, n. 6, p. 1209-1223, 1988.
- BAHGA, C. S.; KHOKAR, B. S. Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing hormone and seminal quality vis-à-vis freezability of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). *Int J Biometeorol*, v. 35, p. 222-224, 1991.
- BARILE, V. L. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livestock Production Science*, v. 92, p. 183-194, 2005.
- BARUSELLI, P. S.; OLIVEIRA, J. F. S.; MENDES, M. L. M. et al. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Brasil: Campinas, v. 94, 16p, 1993. Documento Técnico CATI.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Reprod Anim*, v. 29, n. 1, p. 4-17, 2005.
- BHAKAT, M.; MOHANTY, T. K.; GUPTA, A. K. et al. Effect of season on semen quality parameters in Murrah buffalo bulls. *Buffalo Bulletin*, vol. 34, n. 1, p. 100-112, 2015.
- BHATTACHARYA, P. Reprodução. In: FAO. O Búfalo. Brasília: Ministério da Agricultura e Pecuária/São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, FAO, Série Produção Animal e Saúde, n. 4, 1991, p. 37-50.
- BHOSREKAR, M. R.; MOKASHI, S.; PUROHIT, J. R. et al. R. Studies on the effect of deep freezing and seasons on the leakage of aspartate amino transferase into extracellular medium and sperm morphology of Murrah buffalo bulls. *Animal Reproduction Science*, v. 25, p. 219-226, 1991.
- BRONSON, F. H. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 364, p. 3331-3340, 2009.

- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; RAATH, J. R. et al. Impact of season on seminal characteristics and endocrine status of adult free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*). *J. Reprod. Fert.*, v. 92, p. 47-57, 1991.
- BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology*, v. 144, n. 9, p. 3722-3731, 2003.
- CAMPANILE, G.; BALESTRIERI, M. L. Interaction of environment factors for better production in buffaloes. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002, Belém. *Proceedings...* Belém, 2002, p. 287-297.
- CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; NEGLIA, G. et al. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, v. 121, p.1-11, 2010.
- CARCANGIU, V.; MURA, M. C.; PAZZOLA, M. et al. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1A (*MTNR1A*) gene and its association with reproductive seasonality. *Theriogenology*, v. 76, p. 419-426, 2011.
- CASTRO, T. A. M. G.; CASTRO JR., F. G; OTSUK, I. P. Seasonal variations in physico-biochemical characteristics of mediterranean buffalo semen. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo, v. 3, 1994, p. 189-191.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*. 3.ed.- Belo Horizonte: CBRA, 104p. 2013.
- CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Effect of heat-stress on spermatogenesis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6, 2001, Maracaibo, Venezuela. *Proceedings...* Maracaibo, 2001. p. 289-294
- CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; DELGADILLO, J. A. et al. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, v. 30, p. 157-184, 1992.
- CHEMINEAU, P. Medio ambiente y reproducción animal. *World Animal Review*, 1993.
Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v1650t/v1650t04.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2015.
- CHIARADIA, R. C. F. Aspectos da fisiologia reprodutiva na búfala – Revisão de literatura. 38p. Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 2006.
- COELHO, L. A.; SASA, A.; NADER, C. E. et al. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 4, p. 544-549, 2006.
- CRUDELI, G. A. Fisiología reproductiva del búfalo. Producción en Argentina. *Tecnología en Marcha*, v. 24, n. 5, p. 74-81, 2011.

DI FRANCESCO, S. *Effect of season on reproductive performances in buffalo species (Bubalus bubalis)*. 2010. 165f. Tese (Dottorato di ricerca in produzione e sanità degli alimenti di origine animale) – Università Degli Studi di Napoli Federico II, Napoli.

DIXIT, N. K.; AGARWAL, S. P.; AGARWAL, V. K. et al. Seasonal variations in serum levels of thyroid hormones and their relation with seminal quality and libido in buffalo bulls. *Theriogenology*, v. 22, n. 5, p. 497-507, 1984.

DIXIT, N. K.; AGARWAL, S. P.; AGARWAL, V. K. et al. Seasonal variation in serum levels of steroid hormones and their relation with seminal quality and libido in buffalo bulls. *Theriogenology*, v. 24, n. 3, p. 293-303, 1985.

DUBOCOVICH, M. L.; RIVERA-BERMUDEZ, M. A.; GERDIN, M. J. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*, v. 8, p. 1093-1108, 2003.

EBC. Empresa Brasil de comunicação. *Rebanho de búfalos foi o que mais cresceu no país em 2011*. Disponível em: <<http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2012-10-18/rebanho-de-bufalos-foi-que-mais-cresceu-no-pais-em-2011>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

ELWISHY, A. B. Reproduction in buffaloes in Egypt. V. Climate and reproductive behaviour. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 88, p. 81-88, 1971.

ELSAWAF, S. A.; BADAWY, A. B. A.; ELWISHY, A. B. Seasonal variation in sexual desire and semen characters of buffalo bulls. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 88, p. 222-230, 1971.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

FERRER, A.; MONTES, I.; ALCALÁ, Y. Influencia de la época del año en las características del semen fresco del búfalo de agua. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, v. 4, n. 1, p. 53-58, 2010.

GARCIA, A. R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). *Rev. de Ciênc. Agrár.* n. 45, 2006.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7. ed. Barueri: Manole, 513p, 2004.

HAFS, H. D.; KNISELY, R. C.; DESJARDINS, C. Sperm output of dairy bulls with varying degrees of sexual preparation. *J. Dairy Sci.*, v. 45, n. 6, p. 788-793, 1962.

HEDLUND, P.; LARSSON, B.; ALM, P. et al. Nitric oxide synthase-containing nerves and ganglia in the dog prostate: a comparison with other transmitters. *Histochemical Journal*, v. 28, p. 635-642, 1996.

HEUER C.; TAHIR, M. N.; AMJAD, H. Effect of season on fertility of frozen buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 13, p. 15-21, 1987.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 27 out. 2015.

JACOMINI, J. O. *Aspectos do ciclo estral e do comportamento sexual de búfalos (Bubalus bubalis, var. bubalis)*. 1989. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

JAVED, M. T.; KHAN, A.; KAUSAR, R. Effect of age and season on some semen parameters of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Vet arhiv*, v. 70, n. 2, p. 83-94, 2000.

KALECZYC, J.; TIMMERMANS, J. P.; MAJEWSKI, M. et al. Immunohistochemical characteristics of nerve fibres supplying the porcine vas deferens. A colocalisation study. *Histochem Cell Biol*, v. 107, p. 229-241, 1997.

KARSCH, F. J.; BITTMAN, E. L.; FOSTER, D. L.; et al. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Hog. Horm. Res.*, v. 40, p. 185-232, 1984.

KARSCH, F. J.; BITTMAN, E. L.; ROBINSON, J. E. et al. Melatonin and photorefractoriness: loss of response to the melatonin signal leads to seasonal reproductive transitions in the ewe. *Biology of reproduction*, v. 34, p. 265-274, 1986.

KEPPER, M.; KEAST, J. Immunohistochemical properties and spinal connections of pelvic autonomic neurons that innervate the rat prostate gland. *Cell Tissue Res*, v. 281, n. 3, p. 533-542, 1995.

KHAN, M. S.; BAJWA, M. A.; TAHIR, M. Effect of diet and season on semen characteristics in Nili-Ravi buffalo bulls. *Buffalo Bulletin*, v. 16, n. 3, p. 60-63, 1997.

KOONJAENAK, S. *Semen and sperm characteristics of swamp buffalo (Bubalus bubalis) bulls for artificial insemination in Thailand, in relation to season*. 2006. 53f. Tese (Doutorado) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

KOONJAENAK, S.; CHANATINART, V.; AIUMLAMAI, S. et al. Seasonal variation in semen quality of swamp buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) in Thailand. *Asian J Androl*, v. 9, n. 1, p. 92-101, 2007a.

KOONJAENAK, S.; PONGPENG, P.; WIROJWUTHIKUL, S. et al. Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 67, p. 1424–1435, 2007b.

LPHSI. Livestock and Poultry Heat Stress Indices. In: *The Livestock and Poultry Heat Stress Indices for Cattle, Sheep and Goats*. USA: South Carolina, 1990.

LURIDIANA, S.; MURA, M. C.; PAZZOLA, M. et al. Association between melatonin receptor 1A (*MTNR1A*) gene polymorphism and the reproductive performance of Mediterranean Italian buffaloes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, p. 983-987, 2012.

- MALFATTI, A.; BARBATO, O.; TODINI, L. et al. Blood testosterone levels in Italian Mediterranean buffalo bulls managed in two different breeding conditions. *Theriogenology*, v. 65, p. 1137-1144, 2006.
- MALPAUX, B.; VIGUIÉ, C.; SKINNER, D. C. et al. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 109-117, 1996.
- MANDAL, D. K.; NAGPAUL, P. K.; GUPTA, A. K. Motion characteristics of murreh buffalo bull spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of the plasmallema. *Theriogenology*, v. 60, p. 349-358, 2003.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Biochemistry of spermatozoa: chemical and functional correlations in ejaculated semen. In: Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology and biochemistry and investigative andrology. Alemanha: Berlin, Springer-Verlag, 1981, p. 195-268.
- MARAI, I. F. M.; AYYAT, M. S.; ABD EL-MONEM, U. M. Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand white female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under egyptian conditions. *Tropical Animal Health and Production*, vol. 33, p. 451-462, 2001.
- MARAI, I. F. M.; HAEEB, A. A. M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. *Livestock Science*, vol. 127, p. 89-109, 2010.
- MARQUES, J. R. F.; CAMARGO JUNIOR, R. N. C.; MARQUES, L. C. et al. A bubalinocultura no Brasil: criação, melhoramento e perspectivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 16, 2006, Recife, *Palestras...*, Recife: 2006, 21p.
- MATTOS, P. S. R.; FRANZOLIN, R.; NONAKA, K. O. Concentração plasmática de melatonina em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) ao longo do ano. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v. 52, n. 5 p. 475-478, 2000.
- MAYAHI, S.; MAMOUEI, M.; TABATABAEI, S. et al. Reproductive characteristics and thyroidal function in relation with season in Khuzestan buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Veterinary Research Forum*, v. 5, n. 3, p. 201-205, 2014.
- MIES FILHO, A. Fatores climáticos na reprodução ovina. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, Belo Horizonte, 1983. *Anais...* Campinas, Fundação Cargill, 1984, p. 37-44.
- MIRABELLA, N.; SQUILLACIOTI, C.; VARRICCHIO, E. et al. Innervation of vas deferens and accessory male genital glands in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Neurochemical characteristics and relationships to the reproductive activity. *Theriogenology*, v. 59, p. 1999-2016, 2003.
- MOSSE, G. Estudo do desempenho reprodutivo e produtivo de um rebanho bubalino. In: Encontro sobre bubalinos. Araçatuba - SP, 1979, p. 201-217.

- NAM, N. H. Characteristics of reproduction of the water buffalo and techniques used to improve their reproductive performance. *J. Sci. Dev.*, v. 8, p. 100 – 110, 2010.
- NASCIMENTO, C. N. B.; CARVALHO, L. O. D. M. Características reprodutivas de búfalas da raça Mediterrâneo. In: *Encontro sobre bubalinos*. Araçatuba - SP, 1979, p. 230.
- OBREGÓN, E. B.; DÍAZ, L. T. Reproducción estacional en el macho. *Int. J. Morphol.*, v. 30, n. 4, p. 1266-1279, 2012.
- OHASHI, O. M.; SOUZA, J. S.; VALE, W. G. Aspecto reprodutivo do macho bubalino. In: VALE, W.G. *Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução*. Brasil: Campinas, Fundação Cargill, 1988. v. 2, p. 69-74.
- OLIVEIRA, C. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P. et al. Avaliação do comportamento sexual em touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*): comparação entre os testes da libido feitos em curral e comportamento sexual a campo. *R. Bras. Zootec.*, v. 36, n. 1, 2007.
- OTTONI, D.; EMERICK, L. L.; MAHECHA, G. A. B. et al. Altura do epitélio sensitivo do órgão vomeronasal de machos Nelore aos 30 meses de idade com e sem bloqueio dos ductos incisivos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 21, Belo Horizonte, 2015. *Anais...* Belo Horizonte, 2015, p. 84.
- PACOLA, L. J.; NASCIMENTO, J.; REICHERT, R. H.; RAZOOK, A. G. Desempenho de bubalinos em Sertãozinho (SP). *B. Industr. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 135-141, 1978.
- PALTA, P.; MONDIAL, S.; PRAKASH, B. S. et al. Peripheral inhibin levels in relation to climatic variations and stage of estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 47, p. 989-995, 1997.
- PANDEY, V.; NIGAM, R.; SINGH, P. et al. Influence of season on biochemical attributes of Bhadawari buffalo bull semen: Effect of temperature and humidity. *Journal of animal research*, v. 4, n. 2, p. 201-209, 2014.
- PARMEGGIANI, A.; SEREN, E.; ESPOSITO, L. et al. Plasma levels of melatonin in buffalo cows. In: International Symposium "Prospect of Buffalo Production in the Mediterranean and in the Middle East", Cairo, 1992. *Proceedings...* Cairo, EAAP Publ., 1993, v. 62, p. 401-403.
- PERERA, B. M. A. O.; PATHIRAJA, N.; MOTHAM, X. J. et al. Seasonal differences in plasma testosterone profiles in buffalo bulls. *Theriogenology*, v. 12, n. 1, p. 33-38, 1979.
- PHILLIPS, C. Reproductive behavior. In: Cattle behaviour and welfare. Reproductive strategy. 2. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002. Cap. 11, p. 152-154.
- PRABHU, S. S.; BHATTACHARYA, P. Influence of factors affecting sex drive on semen production of buffaloes. I. Physiological state of the 'teaser' cow. *Semen production of buffaloes*, v. 24, p. 35-50, 1954.
- RAO, L. V.; PANDEY, R. S. Seasonal changes in plasma progesterone concentrations in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *J. Reprod. Fert.*, v. 66, p. 57-61, 1982.

- RAO, L. V.; PANDEY, R. S. Seasonal variations in oestradiol-17 β and luteinizing hormone in the blood of buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *J. Endocr.*, v. 98, p. 251-255, 1983.
- RAZDAN, M. N.; KAKER, M. L.; GALHOTRA, M. M. Serum FSH levels during estrus and a 4-week period following mating in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 17, n. 2, p. 175-181, 1982.
- RIBEIRO, H. F. L. Aspectos reprodutivos de bubalinos criados na região Amazônia. *Rev. de Ciênc. Agrár.* n. 45, 2006.
- ROLIM FILHO, S. T.; RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas bubalinas criadas em sistema misto (várzea e pastagem artificial) no estado do Pará. I. Idade a primeira cria, intervalo entre partos, época de parição, eficiência reprodutiva e taxa de prenhez. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 3, p. 754-763, 2009.
- ROY, K. S.; PRAKASH, B. S. Seasonal variation and circadian rhythmicity of the prolactin profile during the summer months in repeat-breeding Murrah buffalo heifers. *Reprod Fertil Dev*, v. 19, p. 569-75, 2007.
- SAMPAIO NETO, J. C.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R. N. B. et al. Avaliação dos desempenhos produtivo e reprodutivo de um rebanho bubalino no estado do Ceará. *Rev. bras. zootec.* v. 30, n. 2, p. 368-373, 2001.
- SAMO, M. U.; BROHI, N. A.; KAKA, I. et al. Study on sexual behavior and seminal quality characteristics of Kundhi buffalo bulls. *Pak. J. Biol. Sci.*, v. 8, n. 11, p. 1628-1629, 2005.
- SCALA, G.; MARUCCIO, L. Nitric oxide (NO) expression during annual reproductive activity in buffalo epididymis: A histochemical and immunocytochemical study. *Theriogenology*, v. 78, p. 49-56, 2012.
- SHAFIE, M.M. Environmental effects on water buffalo production. In: FAO - Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-v1650t/v1650T0a.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2015.
- SHARMA, L.; PANDEY, V.; NIGAM, R. et al. Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo. *Reprod Dom Anim*, v. 49, p. 387-391, 2014.
- SHIMIZU, H. Adaptation and effect of climatic components in swamp buffalo. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2, 1988, New Delhi. *Proceedings...* New Delhi: ISBD, 1988, p. 147-166.
- SINGH, B.; MAHAPATRO, B. B.; SADHU, D. P. Chemical composition of cattle and buffalo spermatozoa and seminal plasma under different climatic conditions. *J. Reprod. Fert.*, v. 20, p. 175-178, 1969.
- SINGH, J.; NANDA, A. S.; ADAMS, G. P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim Reprod Sci.*, v. 60-61, p. 593-604, 2000.

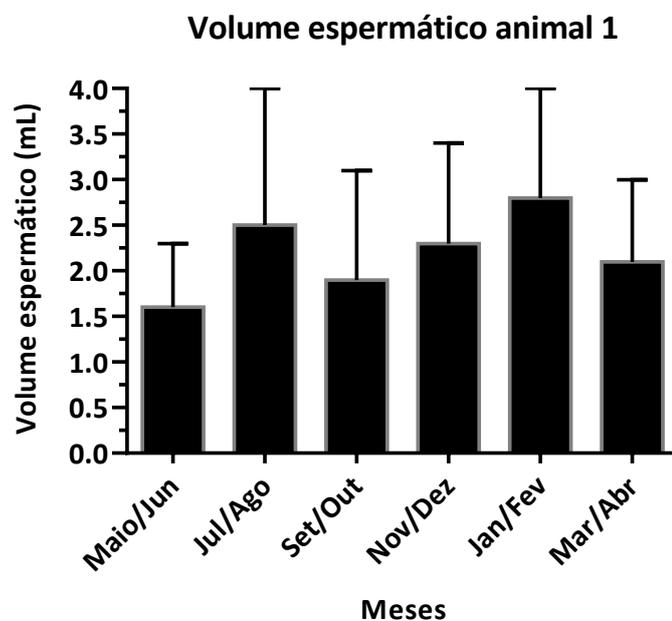
- SINGH, P.; SENGUPTA, B. P.; TRIPATHI, V. N. Effect of multiple showering and vitamin supplementation on sexual behaviour, quality and freezability of buffalo bull semen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, v. 14, n. 2, p. 184-188, 2001.
- SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; OBA, E. Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 33, n. 3, p. 139-148, 2009.
- SKINNER, D. C.; ROBINSON, J. E. Melatonin-binding sites in the gonadotroph-enriched zona tuberalis of ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 104, p. 243-250, 1995.
- SOUZA NETO, J. A.; SCALDAFERRI, P. M. Melatonina e câncer - revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 1, p. 49-58, 2004.
- TAHIR, M. N.; BAJWA, M. A.; LATIF, M. et al. Effects of insemination dose and season on conception rates in buffaloes. *Pakistan Vet. J.*, v. 1, n.4, p. 161, 1981.
- TIWARI, R.; MISHRA, G. K.; SHUKLA, M. K. et al. Seasonal variations in semen production of Murrah buffalo bulls. *Indian Journal of Animal Reproduction*, v. 32, n. 2, p. 5-7, 2011.
- TULI, R. K.; SINGH, M. Seasonal variation in freezability of buffalo semen. *Theriogenology*, v. 20, n. 3, p. 321-324, 1983.
- VALE, W.G. Fisiologia da reprodução na búfala, *Bubalus bubalis*. In: VALE, W.G. Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução. Brasil: Campinas, Fundação Cargill, v. 2, p. 01-28, 1988.
- VALE, W.G. Effects of environment on buffalo reproduction. *Ital. J. Anim. Sci.*, vol. 6, n.2, p. 130-142, 2007.
- VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUZA, J. S. et al. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 32, n. 2, p. 141-155, 2008.
- VIEIRA, R. J. *Respostas fisiológicas e hormonais de novilhas bubalinas submetidas a estresse térmico*. 1995. 146f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.
- ZETOUNI, L.; CAMARGO, G. M. F.; FONSECA, P. D. S. et al. Polymorphisms in the *MTRN1A* gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod*, v. 46, p. 337-340, 2014.
- ZICARELLI, L. Management in Different Environmental Conditions. In: CONGRESSO MUNDIAL DE CRIADORES DE BÚFALOS, 4, 1994, São Paulo. *Anais...* São Paulo, v. 1, p. 88-112.
- ZICARELLI, L. Reproductive seasonality in buffalo. In: COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES, 3, 1997, Caserta. *Proceedings...* Caserta, v. 2, 1997, p. 29-52.
- WADE, G. N.; JONES, J. E. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 287, p. R1277-1296, 2004.

WENKOFF, M. S. The evaluation of bulls for breeding soundness. Manual. 2 ed. Ottawa: Canadian Veterinary, Medical Association, 48p, 1988.

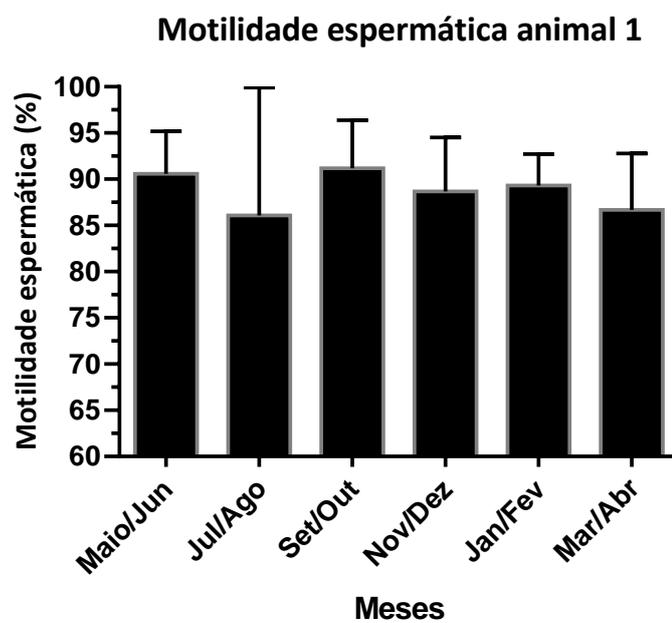
WEST, J. W. Interactions of energy and bovine somatotropin with heat stress. *J. Dairy Sci.*, v. 77, p. 2091-2102, 1994.

9 – ANEXOS

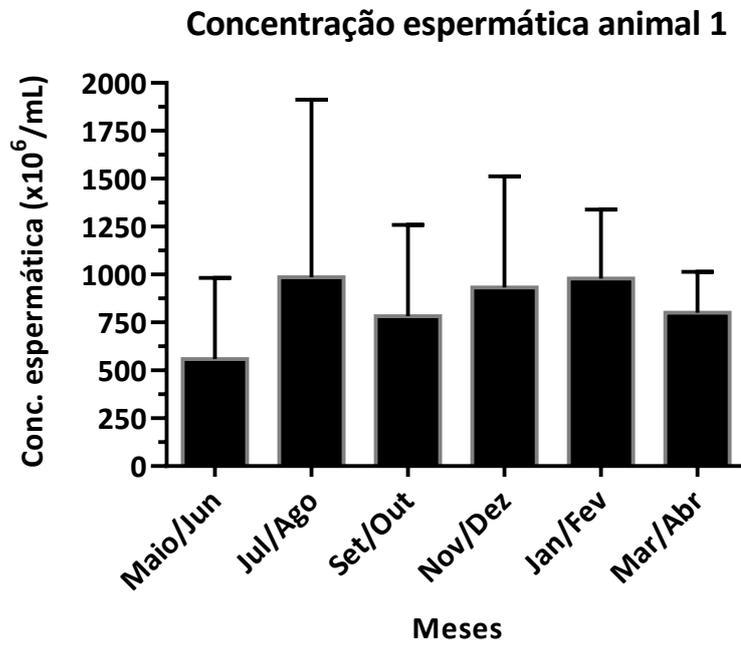
Anexo 1- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 1 no período de 12 meses do experimento



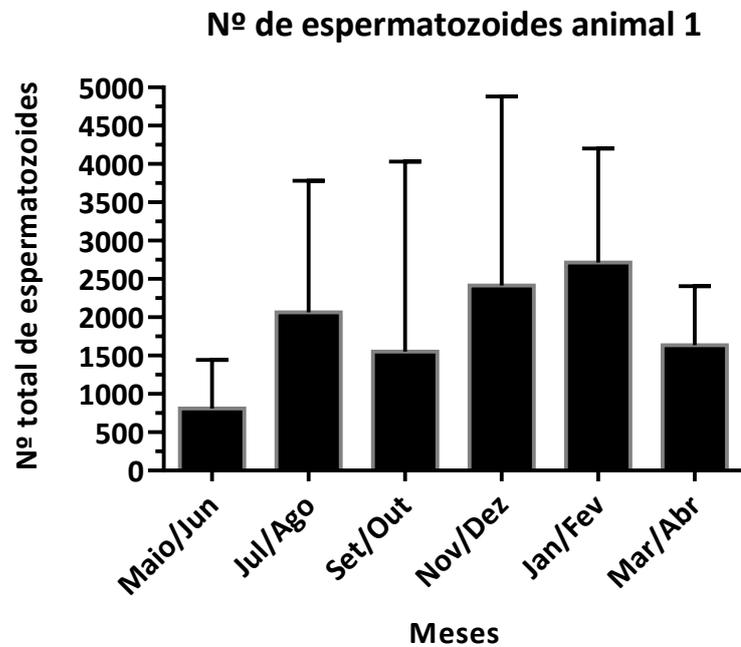
Anexo 2- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 1 no período de 12 meses do experimento



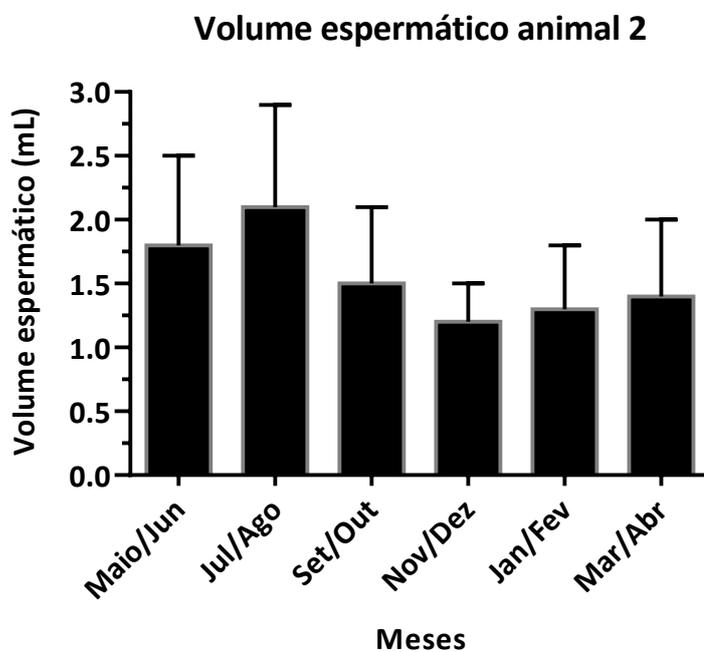
Anexo 3- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 1 no período de 12 meses do experimento



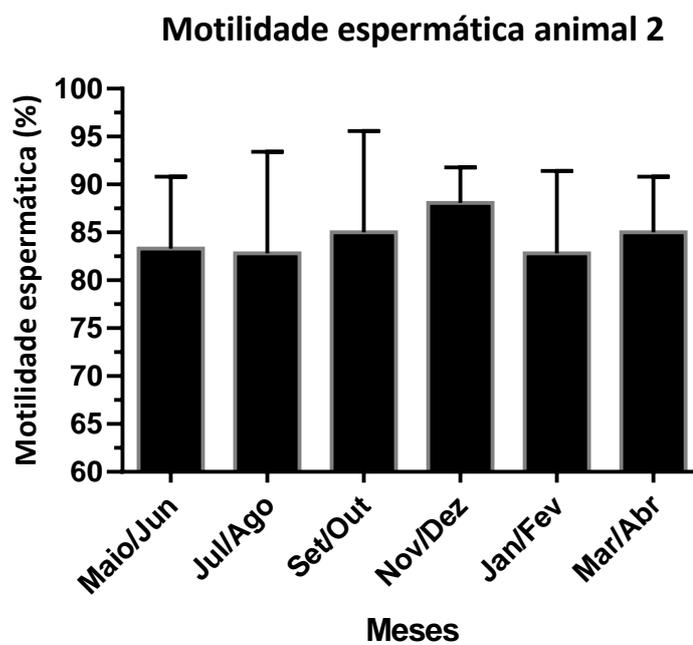
Anexo 4- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 1 no período de 12 meses do experimento



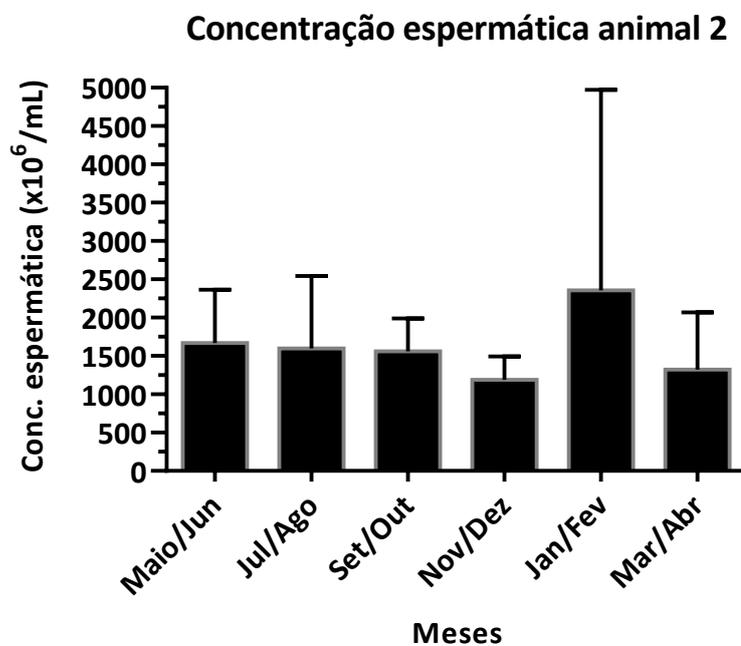
Anexo 5- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 2 no período de 12 meses do experimento



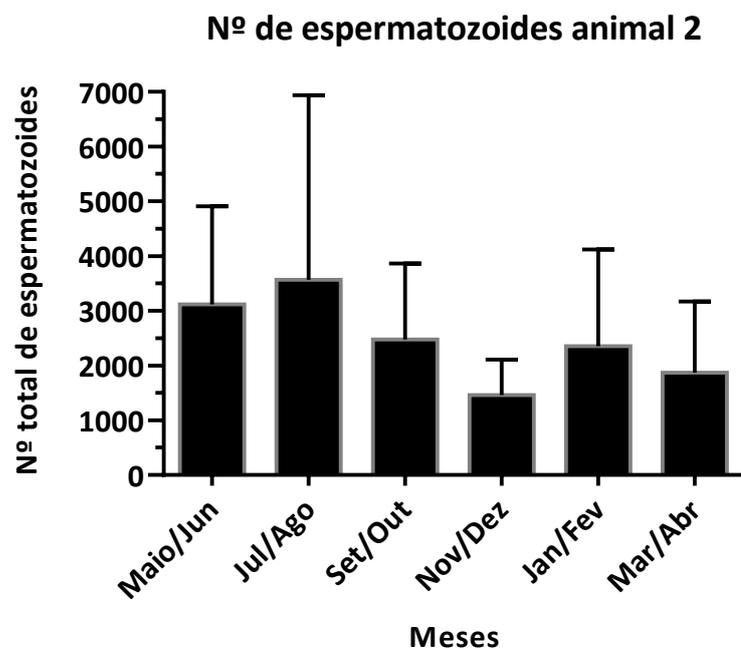
Anexo 6- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 2 no período de 12 meses do experimento



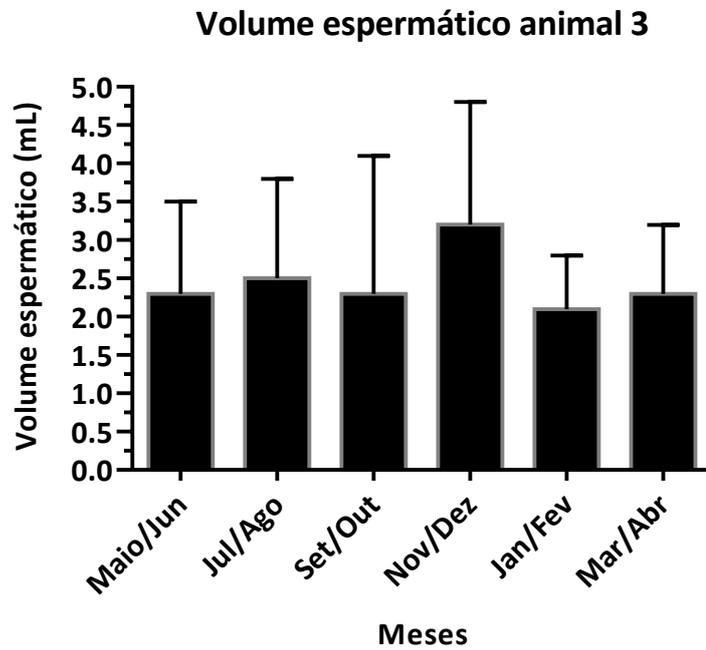
Anexo 7- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 2 no período de 12 meses do experimento



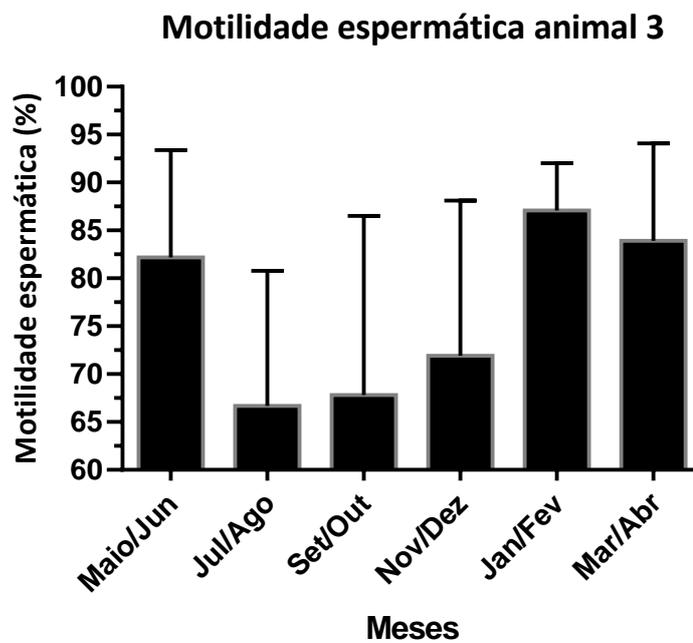
Anexo 8- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 2 no período de 12 meses do experimento



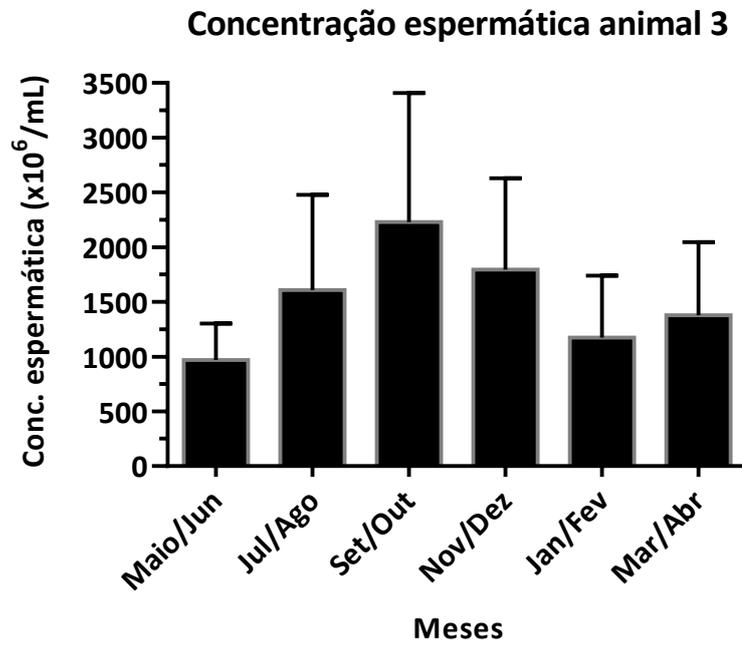
Anexo 9- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 3 no período de 12 meses do experimento



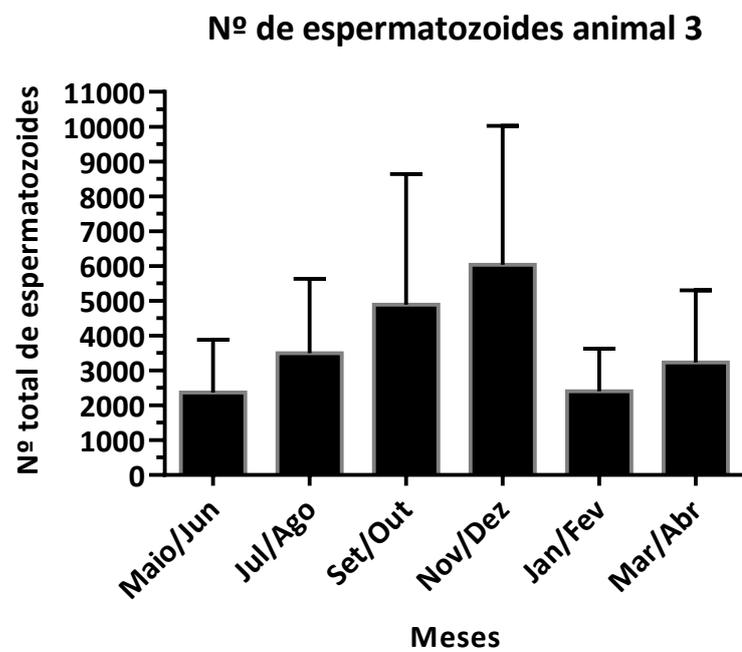
Anexo 10- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 3 no período de 12 meses do experimento



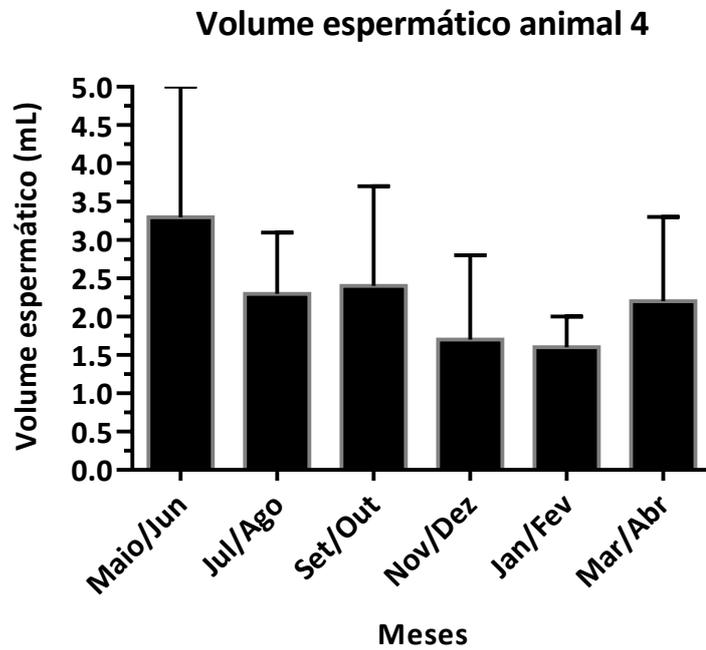
Anexo 11- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 3 no período de 12 meses do experimento



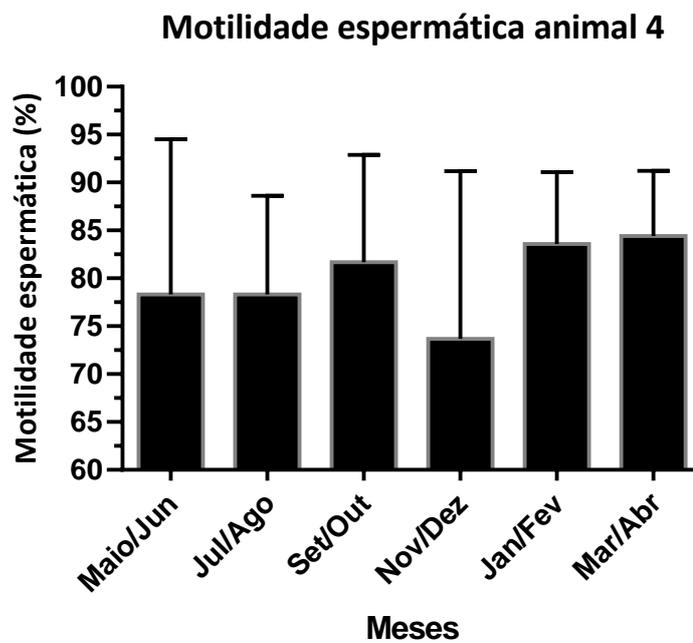
Anexo 12- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 3 no período de 12 meses do experimento



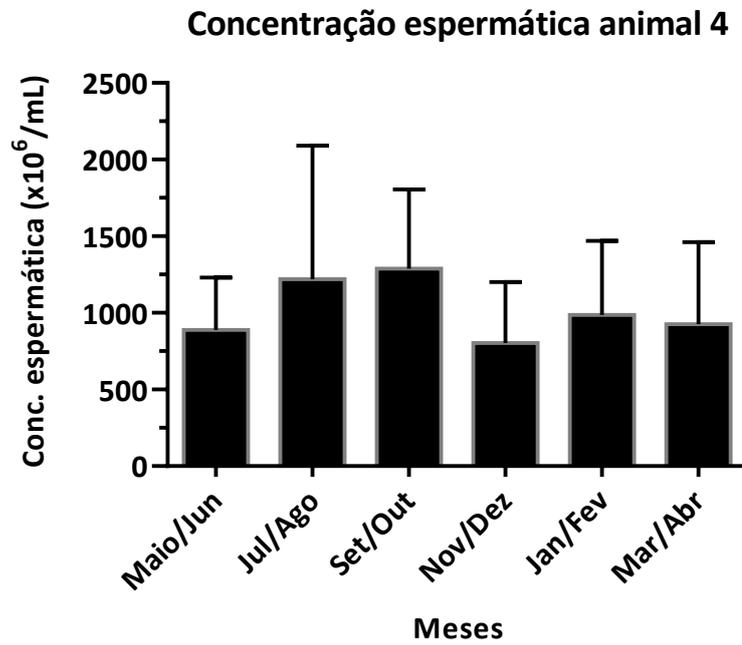
Anexo 13- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 4 no período de 12 meses do experimento



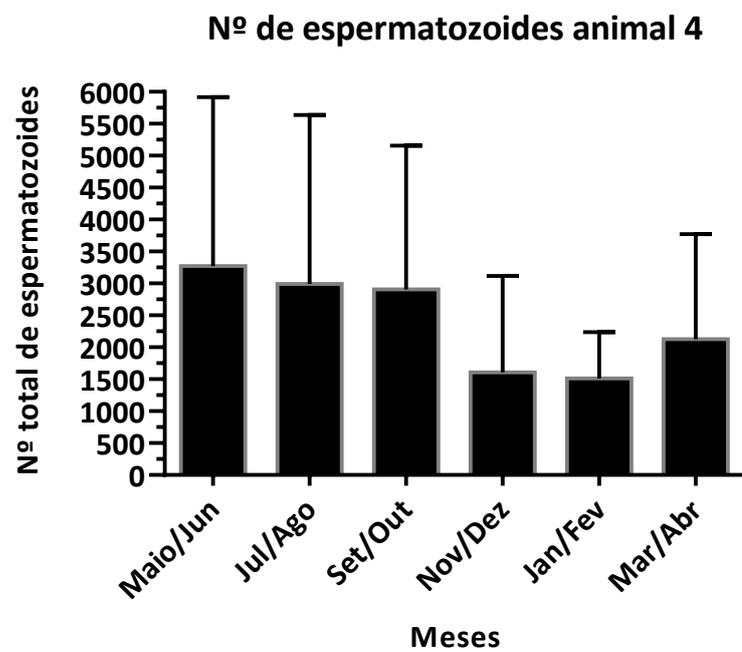
Anexo 14- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 4 no período de 12 meses do experimento



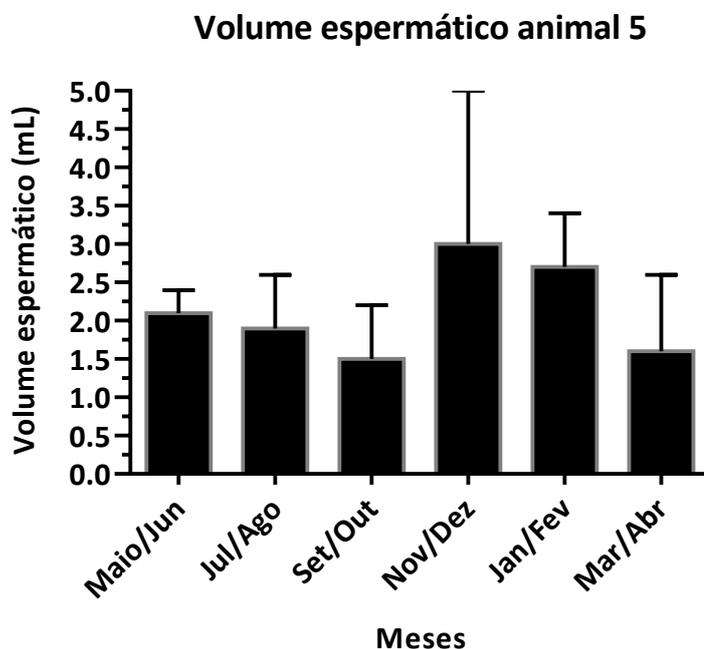
Anexo 15- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 4 no período de 12 meses do experimento



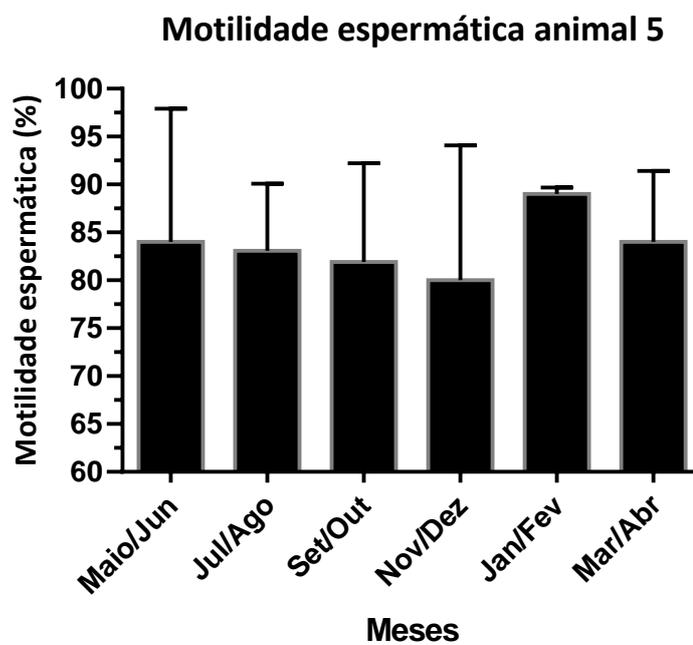
Anexo 16- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 4 no período de 12 meses do experimento



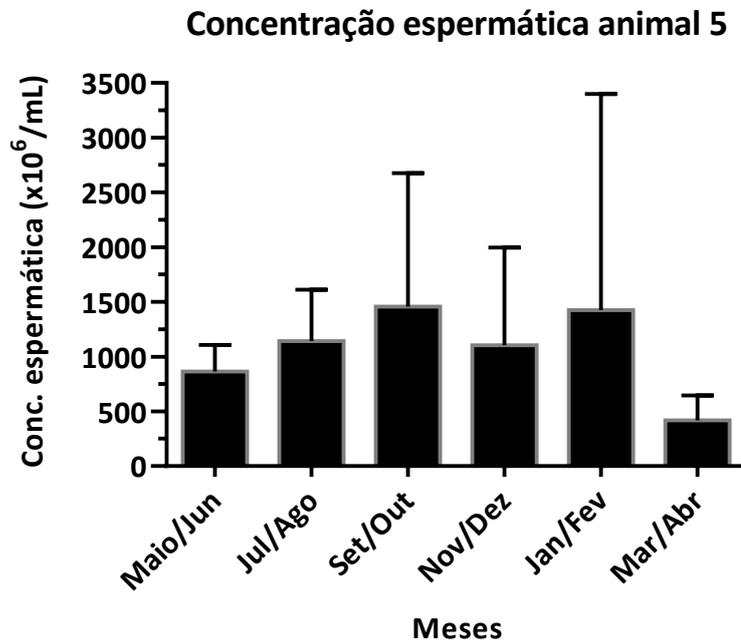
Anexo 17- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 5 no período de 12 meses do experimento



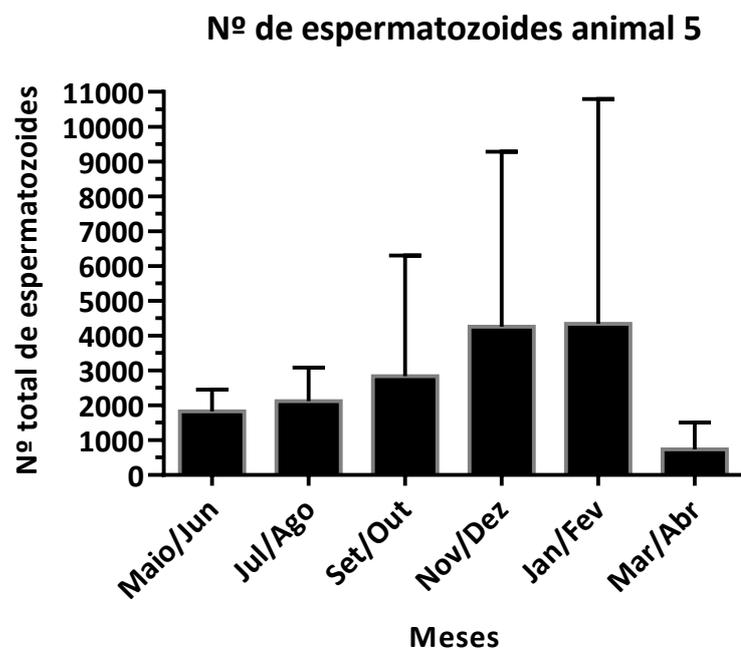
Anexo 18- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 5 no período de 12 meses do experimento



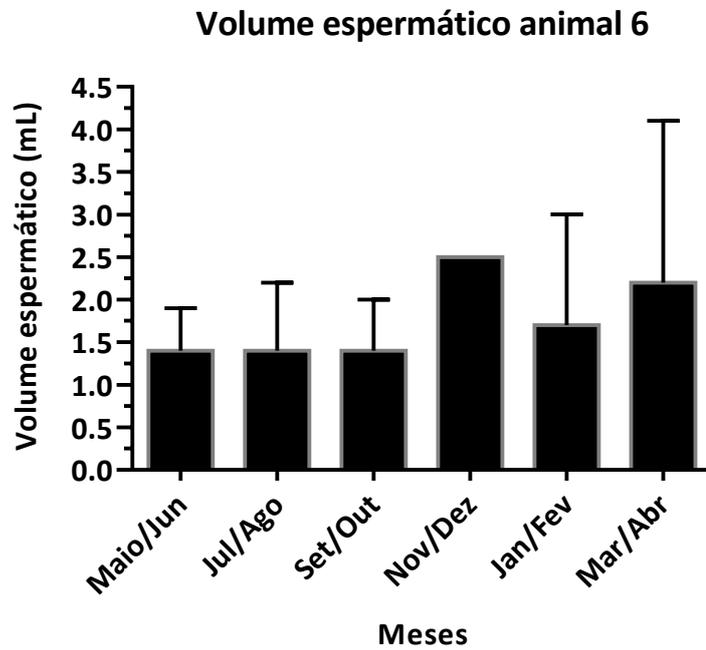
Anexo 19- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 5 no período de 12 meses do experimento



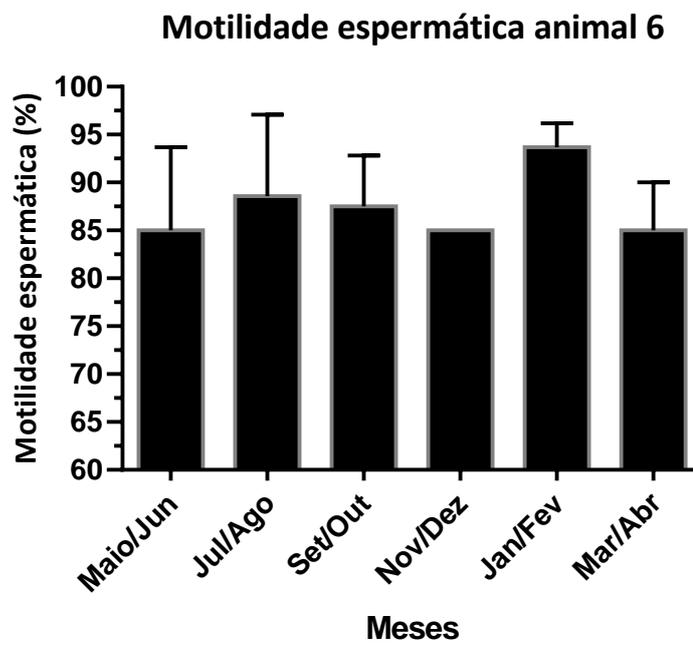
Anexo 20- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 5 no período de 12 meses do experimento



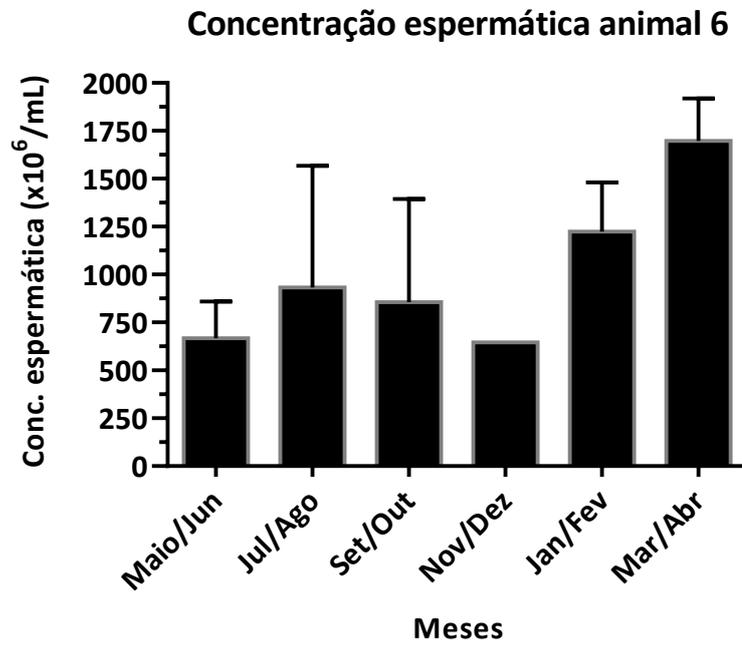
Anexo 21- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 6 no período de 12 meses do experimento



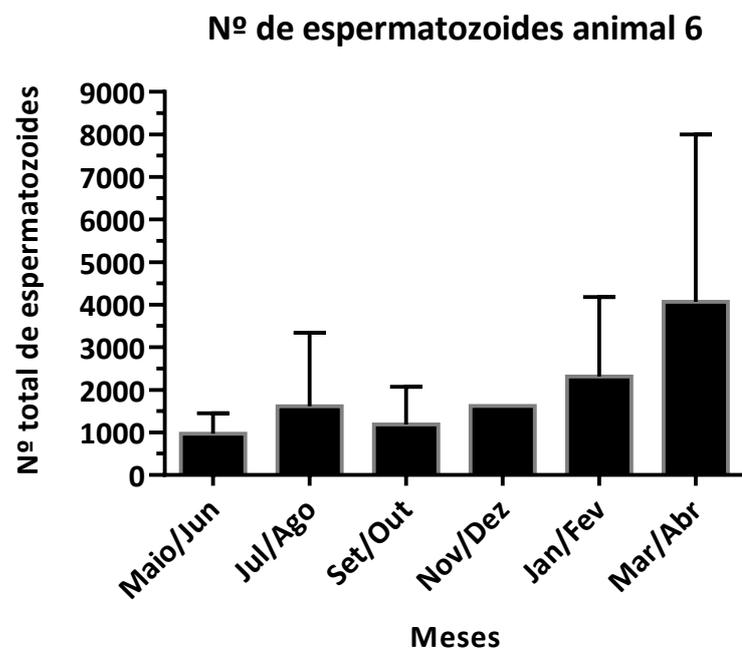
Anexo 22- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 6 no período de 12 meses do experimento



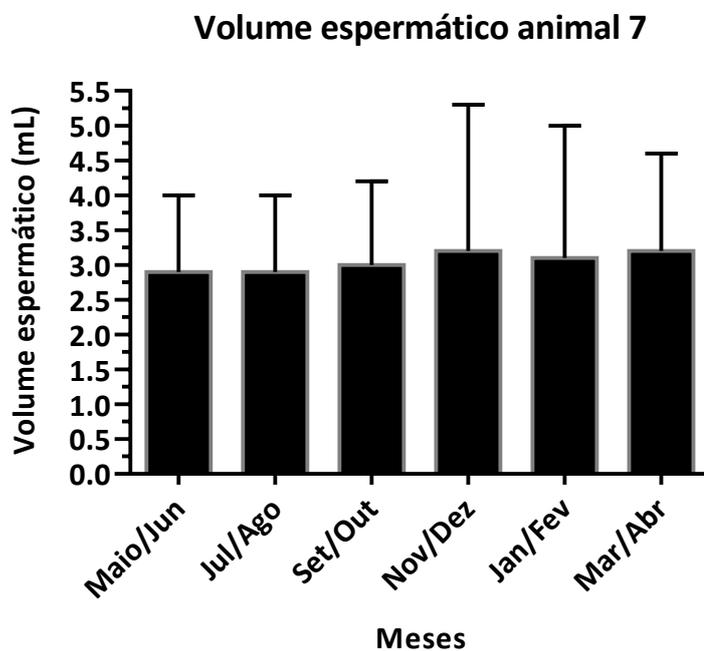
Anexo 23- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 6 no período de 12 meses do experimento



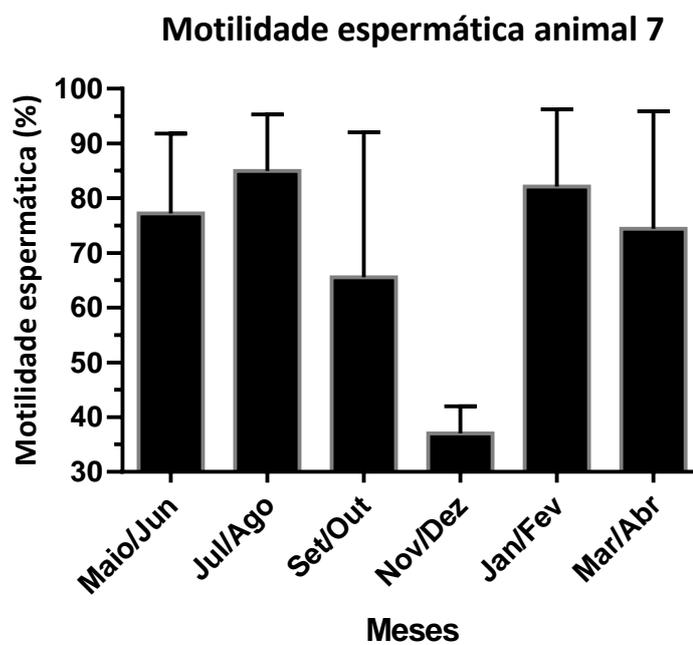
Anexo 24- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 6 no período de 12 meses do experimento



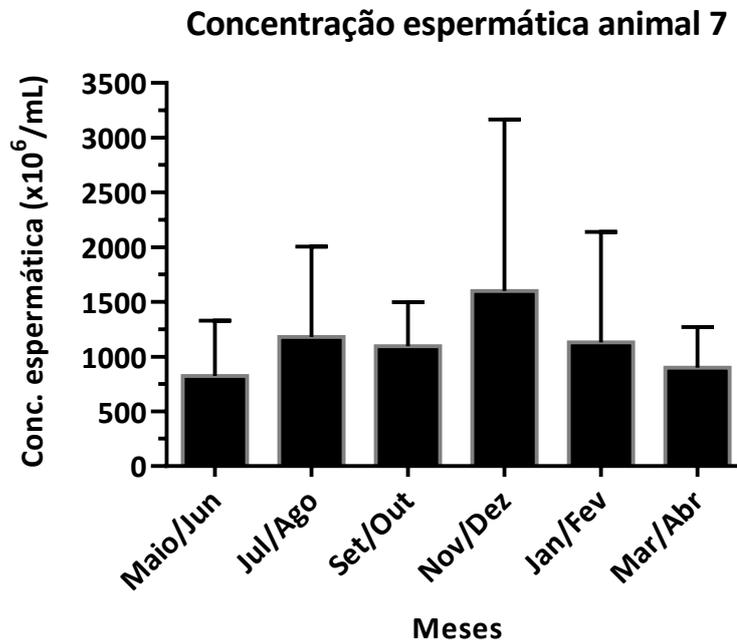
Anexo 25- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 7 no período de 12 meses do experimento



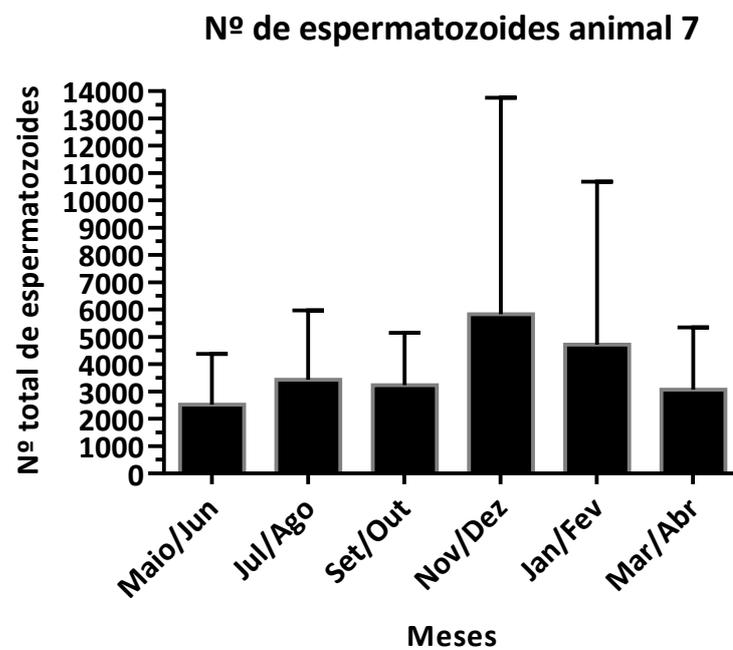
Anexo 26- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 7 no período de 12 meses do experimento



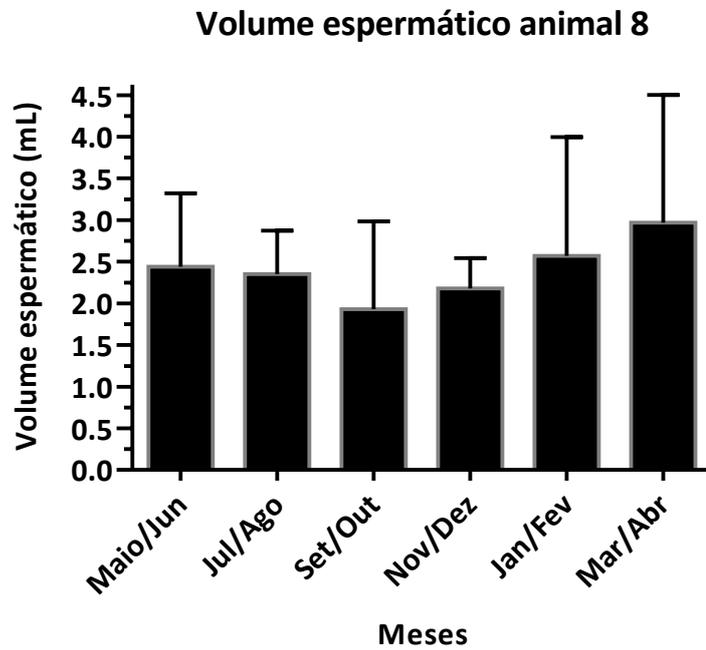
Anexo 27- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 7 no período de 12 meses do experimento



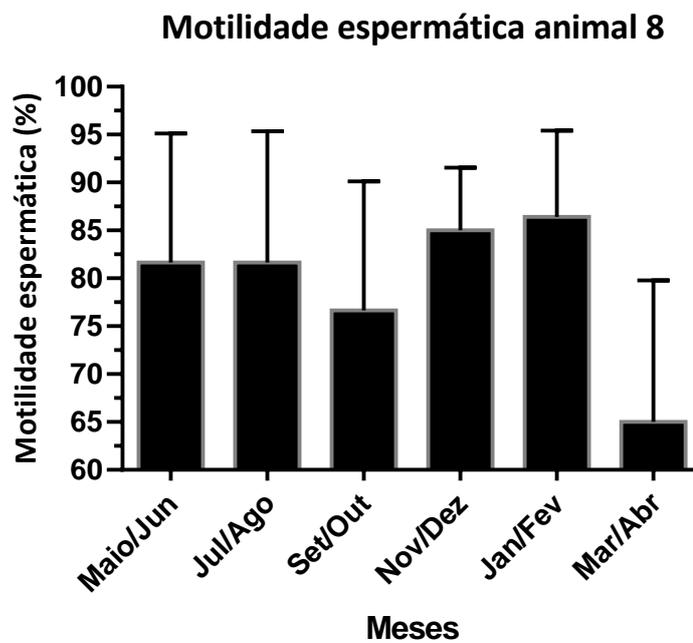
Anexo 28- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 7 no período de 12 meses do experimento



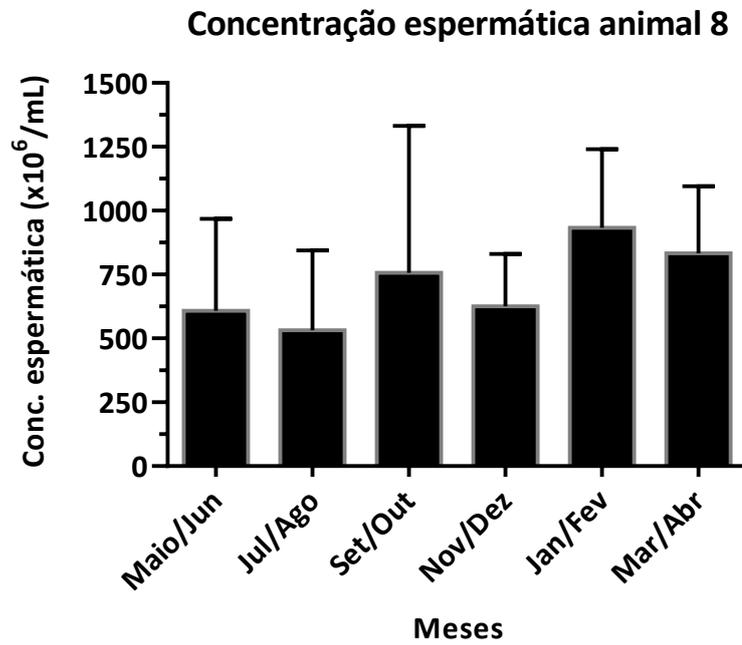
Anexo 29- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 8 no período de 12 meses do experimento



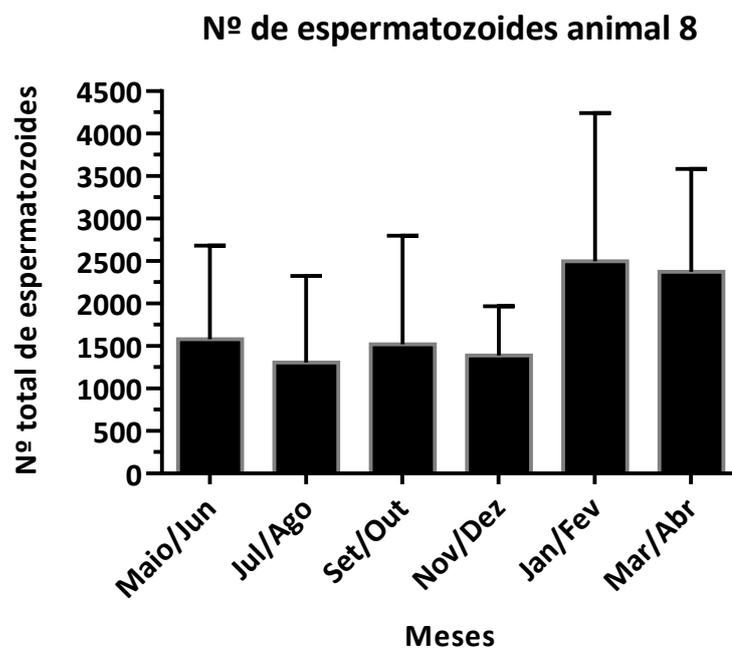
Anexo 30- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 8 no período de 12 meses do experimento



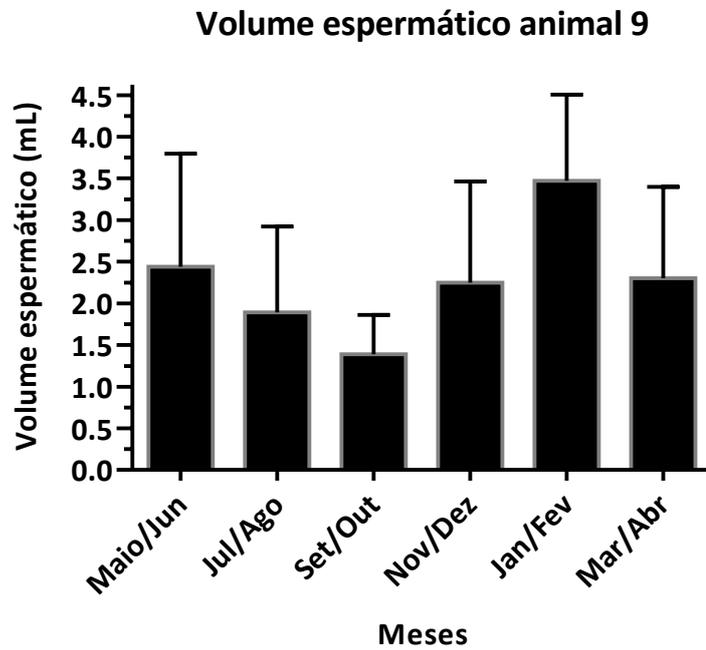
Anexo 31- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 8 no período de 12 meses do experimento



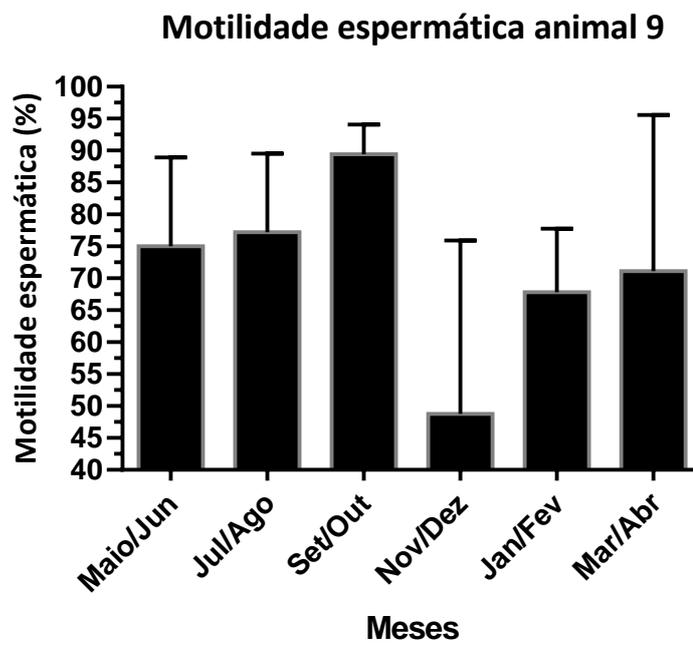
Anexo 32- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 8 no período de 12 meses do experimento



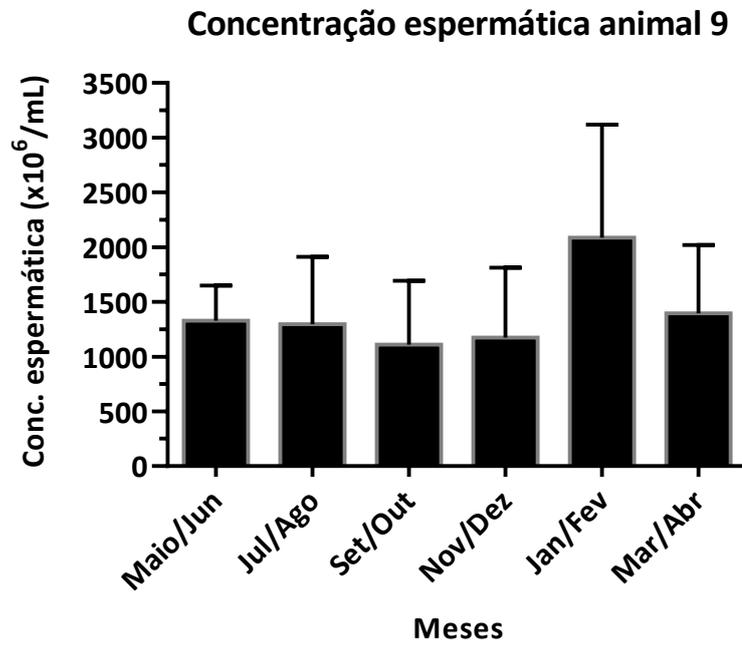
Anexo 33- Médias e desvio padrão bimestrais do volume espermático (mL) do animal 8 no período de 12 meses do experimento



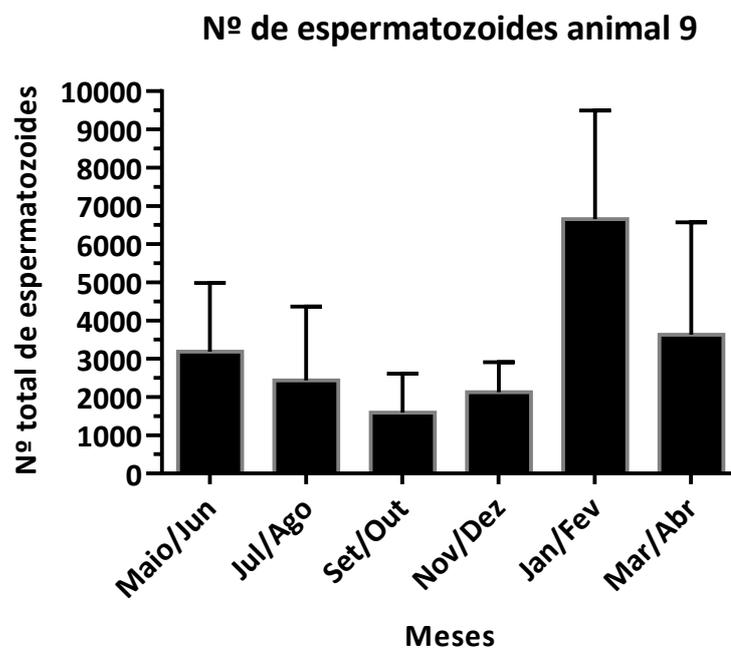
Anexo 34- Médias e desvio padrão bimestrais da motilidade espermática (%) do animal 8 no período de 12 meses do experimento



Anexo 35- Médias e desvio padrão bimestrais da concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) do animal 1 no período de 12 meses do experimento



Anexo 36- Médias e desvio padrão bimestrais do número total de espermatozoides ($\times 10^6$) do animal 1 no período de 12 meses do experimento



Anexo 37- Média \pm desvio padrão bimestrais da porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais de cada animal no período de 12 meses do experimento

Touros	Espermatozoides normais (%)					
	Maio/Junho	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev	Março/Abril
1	93,1 \pm 2,1	92,5 \pm 2,6	87,5 \pm 3	86,1 \pm 11,8	93,8 \pm 2,6	90,2 \pm 3,7
2	90,3 \pm 1,9	89,8 \pm 2,3	86,4 \pm 3,7	91,5 \pm 3,7	89,4 \pm 2,1	90 \pm 3
3	94,2 \pm 3,1	91,2 \pm 3,5	88,2 \pm 4,2	92,5 \pm 2,8	94,6 \pm 1,8	95,1 \pm 1,5
4	90,7 \pm 2,5	91,3 \pm 2	83,7 \pm 4,4	89,7 \pm 2,8	88,8 \pm 1,8	93,2 \pm 1,5
5	93,4 \pm 2,6	93,7 \pm 2,6	91 \pm 2,7	90,5 \pm 6,7	93,1 \pm 2,8	93,1 \pm 3,2
6	91,3 \pm 1,5	94,2 \pm 2,3	88,37 \pm 3,3	88,5 \pm 2,1	89,2 \pm 1,7	93,2 \pm 3,3
7	92,3 \pm 2,2	91,3 \pm 1,8	89,7 \pm 4,4	88,6 \pm 5,2	90,7 \pm 8,1	93,9 \pm 3,4
8	89,1 \pm 3	85,8 \pm 5	79,8 \pm 4,9	88,1 \pm 5	87,4 \pm 2,9	90,1 \pm 3
9	93,2 \pm 2,2	90,1 \pm 4,5	87,7 \pm 5,2	86,1 \pm 4,3	90,9 \pm 2,9	93 \pm 3,3
Média	92 \pm 1,7	91,2 \pm 2,5	87 \pm 3,4	89,5 \pm 2,7	91,2 \pm 2,5	92,3 \pm 1,8

Anexo 38- Médias do tempo de reação de cada animal no período de 12 meses do experimento

Touros	Tempo de reação (s)					
	Maio/Junho	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev	Março/Abril
1	77,4	98,3	101,6	97,2	110,7	46,2
2	54,8	57,7	46,6	85,4	42,6	81
3	57,1	177,6	87,7	327,5	162,9	120,7
4	74,5	75,7	60,2	72	39,5	35,4
5	123,6	185,9	235,7	186	249,1	153,5
6	268	108,1	168,5	220,2	161,4	213,1
7	84,9	80,7	93,2	99,5	138,6	136,2
8	72,7	51,5	85,8	128,2	55,6	51,1
9	80,9	88,1	165,1	103,3	80,2	55
Média	99,3	102,6	116	146,6	115,6	99,1