

# SAZONALIDADE NA CONGELABILIDADE DE SÊMEN BOVINO

Vanessa Lopes Dias Queiroz<sup>1</sup>  
 Luiz Carlos Cesar da Costa Filho<sup>1</sup>  
 Lorena da Silva Rosa<sup>1</sup>  
 Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari<sup>1</sup>  
 Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>1</sup>

QUEIROZ, V. L. D.; COSTA FILHO, L. C. C. da; ROSA, L. da S.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA e SILVA, E. V. Sazonalidade na congelabilidade de sêmen bovino. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v.18, n.1, p. 39-47, jan./mar. 2015.

**RESUMO:** O objetivo desta revisão foi apresentar e discutir os efeitos da sazonalidade nas características seminais de touros *Bos taurus* e *Bos indicus* antes e após o congelamento, a fim de possibilitar maior rentabilidade econômica. Apesar da reprodução da espécie bovina não se caracterizar pela sazonalidade, estudos mostram a interferência das estações do ano na qualidade do sêmen de touros. O aumento da temperatura ambiente pode levar a elevação da temperatura testicular, das taxas metabólicas e das exigências de oxigênio, ocasionando alterações na espermatogênese e, por consequência, a um impacto negativo na reprodução. Touros *Bos indicus* obtêm melhor desempenho na estação mais quente do ano apresentando uma qualidade de sêmen satisfatória em relação a touros *Bos taurus*. Isso se deve à maior resistência dos zebuínos às altas temperaturas e a peroxidação lipídica causada pelo calor resultando em menor produção de espécies reativas ao oxigênio e menor aumento nos defeitos nas células espermáticas. Desse modo, touros de origem europeia não apresentam um bom desempenho durante alguns períodos mais quentes do ano o que leva a questionar se a relação custo-benefício de aproveitamento do sêmen para criopreservação justifica o processamento do mesmo pelas Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen nesta época. Esse fato tem levado algumas empresas a suspender atividades em determinados meses do ano.

**PALAVRAS CHAVE:** Ambiente. Criopreservação. Espermatozoide. Estresse oxidativo.

## SEASONALITY IN THE FREEZABILITY OF BOVINE SEMEN

**ABSTRACT:** The objective of this review was to present and discuss the effects of seasonality in the semen characteristics of *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls before and after freezing in order to enable greater economic profitability. Even though the bovine reproduction is not characterized by seasonality, studies have shown the interference of the season on semen quality in bulls. The increase of temperature may lead to increase in testicular temperature, metabolic rates and oxygen requirements. Both thermal and oxidative stress will cause changes in the normal development of spermatogenesis, changing volume, sperm concentration, progressive motility, vigor and morphology of sperm cells, resulting in an economically negative impact on reproduction. *Bos indicus* bulls presented better performance in the hottest season of the year, showing a satisfactory quality of semen when compared to *Bos taurus* bulls. This is due to the greater resistance to high temperatures of zebu bulls and lipid peroxidation caused by the heat resulting in lower production of species reactive to oxygen and smaller increases in defects in sperm cells. Thus, European bulls, such as *Bos Taurus*, do not present a good performance in some of the hottest periods of the year, which leads to questioning if the cost-effective use of semen cryopreservation justifies its processing by the Semen Collection and Processing Centers during these periods. This fact has led some national centers for semen suspend activities in certain months of the year.

**KEYWORDS:** Environment. Stress. Cryopreservation. Sperm.

## ESTACIONALIDAD EN CONGELAMIENTO DE SEMEN BOVINO

**RESUMEN:** El objetivo de esta revisión ha sido presentar y discutir los efectos de la estacionalidad en las características del semen de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* pre y post congelación, con el fin de proporcionar mayor rentabilidad económica. A pesar de la reproducción vacuna no caracterizarse por la estacionalidad, estudios muestran la interferencia de las estaciones del año en la calidad del semen de toros. El aumento de la temperatura ambiente puede conducir a elevada temperatura testicular, de las tasas metabólicas y de las exigencias de oxígeno, ocasionando alteraciones en la espermatogénesis y, por lo tanto, a un impacto negativo en la reproducción. Toros *Bos indicus* presentaron mejor rendimiento en la temporada más calurosa del año, presentando calidad de semen satisfactoria en comparación con toros *Bos taurus*. Esto es debido a mayor resistencia del ganado cebú a las altas temperaturas y la peroxidación de lípidos causada por el calor, que resulta en menor producción de especies reactivas al oxígeno y menos defectos en las células espermáticas. Así, toros de origen europea no presentan buen desempeño durante algunos períodos más calurosos del año, lo que lleva a cuestionar si la relación costo beneficio de aprovechamiento del semen para criopreservación justifica la tramitación del mismo por las Centrales de Recogida y Procesamiento de Semen en este periodo. Este hecho ha llevado a algunas empresas a suspender las actividades en ciertos meses del año.

**PALABRAS CLAVE:** Ambiente. Criopreservación. Esperma. Estrés oxidativo.

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v18i1.2015.5368>

<sup>1</sup>FAMEZ / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. [vanessalopq@hotmail.com](mailto:vanessalopq@hotmail.com); [eliane.silva@ufms.br](mailto:eliane.silva@ufms.br). Laboratório de Reprodução Animal, FAMEZ/UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS, CEP 79074-460

## Introdução

Sabe-se que muitos fatores, dentre os quais, temperatura, umidade, nutrição, parasitoses, doenças e alterações ambientais de diferentes origens, afetam a produção animal (HORN; MORAES; GALINA, 1999). Apesar da reprodução da espécie bovina não se caracterizar pela sazonalidade como ocorre em outras espécies, as condições climáticas têm-se mostrado muito relevantes uma vez que são associadas a alterações na qualidade do sêmen de touros.

É sabido que entre os agentes causadores de estresse encontram-se os fatores climáticos, representados por frio ou calor excessivos. A temperatura testicular deve ser mantida por volta de aproximadamente 4-6°C abaixo da temperatura corporal para a ocorrência da espermatogênese em touros saudáveis (KASTELIC; COOK; COULTER, 1997).

Segundo Silva (2000), os efeitos nocivos sobre o sêmen de touros causados pelo estresse térmico ocorrem também em animais adaptados ao clima tropical brasileiro.

Devido ao sistema de criação predominantemente extensivo no país e a monta natural, faz-se necessário uma maior investigação sobre fatores climáticos, uma vez que touros expostos a essas variações são predispostos a fatores estressantes que podem interferir na sua fisiologia reprodutiva acarretando prejuízos econômicos. Contudo, a permanência de reprodutores em Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen não garante que o isolamento do efeito da estação do ano seja reduzido (SILVA et al., 2009a).

Esta revisão apresenta e discute os efeitos da sazonalidade sobre as características do sêmen pré, pós-congelamento em diferentes espécies bovinas, a fim de encontrar uma época do ano que possibilite uma menor interferência climática na qualidade do sêmen obtendo-se maior rentabilidade econômica.

## Desenvolvimento

### Mecanismos de termorregulação frente ao estresse térmico

#### Respostas endócrinas

Bovinos expostos a condições climáticas consideradas estressantes como calor ou frio excessivo, apresentam fisiologicamente inúmeras reações de adaptação ao ambiente desencadeando a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e, por conseguinte alteração no sistema endócrino. Em resposta ao acionamento desse eixo, ocorre queda dos níveis hormonais tireoidianos em decorrência da diminuição da secreção do hormônio estimulante da tireóide pela hipófise (MORAES et al., 2008).

A glândula tireóide é sensível ao estresse térmico, pois seus hormônios atuam sobre a termogênese e apresentam ação potenciadora sobre as catecolaminas. Portanto, a triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tiroxina (T<sub>4</sub>) podem apresentar baixos níveis em animais expostos a temperaturas elevadas associadas à menor produção de calor metabólico. Bovinos quando expostos por tempo prolongado ao calor apresentam hipofunção da tireóide que pode estar associado à necessidade de diminuição da taxa metabólica (PEZZI; ACCORSI; GOVONI, 2003). Por conseguinte, os testículos tornam-se mais

susceptíveis a uma disfunção termorregulatória apresentando sêmen de baixa qualidade.

Frente a situações de estresse pode ocorrer liberação de opióides endógenos por células neurosecretoras que levam à supressão da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (BENTLEY; TSUTSUIC; KRIEGSFELDB, 2010). O GnRH atua no lobo anterior da hipófise estimulando a liberação do hormônio luteinizante (LH) que possui como função controlar a secreção de testosterona pelas células de Leydig, presentes no tecido intersticial do parênquima testicular, vital para a ocorrência da espermatogênese (HAMANO et al., 2007).

### Termorregulação escrotal e testicular

As variações de temperatura influenciam a espermatogênese. Estresse por calor provocado por insolação escrotal leva à queda da motilidade progressiva dos espermatozoides vivos e aumento das alterações morfológicas espermáticas (BRITO et al., 2002).

De acordo com Gabaldi e Wolf (2002), a termorregulação é realizada por mecanismos locais especializados, como a atividade do músculo cremaster e da túnica dartus, sendo que o músculo atua variando a proximidade dos testículos com o corpo. Quando a temperatura ambiente é baixa, esses músculos se contraem a fim de causar a aproximação dos testículos à parede corporal. Quando é caracterizada por calor, há o relaxamento dos mesmos para que a temperatura testicular seja a ideal para a ocorrência da espermatogênese. A túnica dartus também permite alterar a espessura e área de superfície do escroto, o qual, frente a situações de frio apresenta um enrugamento e engrossamento da sua parede e no calor essa túnica torna a parede mais fina a fim de manter a termorregulação.

Outro mecanismo local é a troca de calor pelo mecanismo contracorrente presente no funículo espermático. Este é constituído por um plexo pampiniforme constituído por uma veia testicular circulando sangue venoso, mais frio, enovelado sobre uma artéria testicular contendo sangue arterial – sangue à temperatura corporal (BARROS et al., 2011). A troca de calor ocorre devido a extensas circunvoluções da artéria e uma veia testicular em cada testículo permitindo que o sangue arterial seja resfriado antes de adentrar nos testículos, da mesma forma que o sangue venoso seja aquecido antes de adentrar na cavidade abdominal. Nesse mecanismo local, além de possuir uma longa extensão plausível com a eficiência da troca de calor, a artéria testicular também propicia uma diminuição do fluxo sanguíneo arterial, acarretando assim, um aumento no tempo de contato com o sangue venoso que está saindo dos testículos (BRITO et al., 2004). Desse modo, esse mecanismo sofre influência da extensão dos vasos, do fluxo entre os condutos, do tempo de contato entre eles e da distância (SETCHELL; VOLGMAYR; HINKS, 1971).

A sudorese escrotal é uma forma de perda de calor relevante, sendo mais eficiente nas raças zebuínas resultante de um maior número de glândulas sudoríparas presentes em relação aos touros de raça européia (KASTELIC; COULTER, 1993). Além disso, os zebuínos apresentam glândulas saculiformes de maior diâmetro e grande volume (PAN, 1964).

## Parâmetros oxidativos do sêmen

O aumento da temperatura ambiente pode levar a aumento da temperatura testicular, das taxas metabólicas e das exigências de oxigênio. A produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) é provavelmente aumentada devido à hipóxia (WIHELM FILHO et al., 2004). As ROS nada mais são que radicais livres, ou seja, átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1991). Entre as ROS, as que possuem maior importância é a radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o óxido nítrico (NO<sub>2</sub>).

No macho, os tecidos reprodutivos estão normalmente expostos às ROS que são geradas como produtos do metabolismo normal (FUJII et al., 2003).

O estresse oxidativo é causado por ROS que podem causar danos estruturais em biomoléculas, lipídeos, proteínas, carboidratos, entre outros. Altas concentrações de ROS podem levar a alterações patológicas em células espermáticas e intensificar a peroxidação lipídica que, eventualmente, resulta na perda de motilidade. Têm-se assumido que o transporte na cadeia de elétrons é a fonte de produção de ROS excessivo e a peça intermediária da célula espermática contém mitocôndrias sendo então especialmente suscetível à peroxidação (BROUWERS; GADELLA, 2003). Este impacto negativo na reprodução torna-se evidente por meio da rápida perda intracelular de ATP pelos espermatozoides, danos ao axonema e alterações na morfologia (SIKKA, 1996). Entretanto, baixos níveis de ROS estimulam a hiperatividade dos espermatozoides, a capacitação e reação acrossomal favorecendo a fecundação (MAKKER; AGARWAL; SHARMA, 2009).

Nas células espermáticas a atividade de enzimas antioxidantes citoplasmáticas é muito baixa (BILODEAU et al., 2000). A pequena quantidade de citoplasma na cabeça e cauda dos espermatozoides os torna suscetíveis ao estresse oxidativo. Outro fator importante é que a membrana plasmática espermática contém ácidos graxos poliinsaturados em abundância que proporcionam a fluidez necessária para participar nos eventos de fusão de membrana associados à fertilização (LENZI et al., 2005, ARGAWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003). Contudo, ataques de radicais livres e o início de uma cascata de peroxidação lipídica, tornam-se mais contundentes pela presença de ligações duplas nessas moléculas (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

Ao contrário dos espermatozoides, o plasma seminal é uma fonte vital de antioxidantes como a glutatona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD), ácido úrico e vitamina E (ARGAWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003, RAI-JMAKERS et al., 2003). Por isto as células espermáticas são altamente dependentes do plasma seminal para lhes conferir proteção antioxidante.

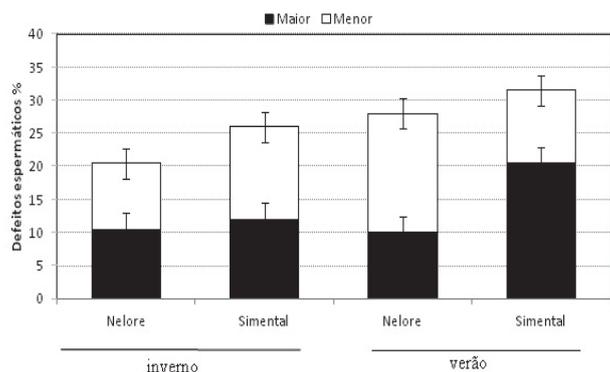
O estresse oxidativo pode ser avaliado por meio da quantificação direta das ROS, dos antioxidantes e por mensuração dos produtos finais gerados pelo estresse. O método mais frequentemente utilizado é a mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse método baseia-se em quantificar indiretamente o estresse oxidativo por meio da medição da concentração do malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica (NACHI et al., 2006).

A fim de realizar a mensuração da glutatona peroxidase (GSH-Px) e do ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no plasma seminal, Majic' Balic' et al. (2012) conduziram um experimento com amostras de sêmen obtidas uma vez por estação (primavera, verão, outono e inverno), coletadas por meio de vagina artificial, de 19 touros de serviço da raça Simental com idade entre dois e 10 anos, durante manuseio de rotina de coleta de sêmen no Centro Croata de Reprodução Animal. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com sua idade. O grupo I se constituiu de animais de dois a quatro anos e no grupo II com idade entre cinco e 10 anos. Nesse estudo a atividade da enzima GSH-Px foi medida utilizando Kits de teste fabricados por Randox (RANSEL, Irlanda), com um analisador automático Saba 18 (MAS, Itália). A reação da glutatona (GSH) como o peróxido de hidrogênio é catalizada pela GSH-Px. Na presença de NADPH e da glutatona reductase há a conversão da glutatona oxidada para glutatona reduzida com simultânea oxidação do NADPH, ou seja, este é consumido na reação. A concentração da GSH-Px foi avaliada pela diminuição da absorção medida com um espectrofotômetro. A medição da concentração de malondialdeído, um produto final da peroxidação de radicais livres de ácidos graxos insaturados, foi determinada espectrofotometricamente. As concentrações plasmáticas seminais de TBARS medidas em ambos os grupos de animais variaram consideravelmente com a estação. Assim, elas foram significativamente maiores no grupo I no verão (P<0,01). Já no grupo II a intensidade dos processos oxidativos foi maior durante o inverno. Esses autores concluíram que a temperatura ambiental elevada durante o verão acomete mais os touros jovens, intensificando os processos oxidativos no plasma seminal levando a uma diminuição na motilidade progressiva espermática.

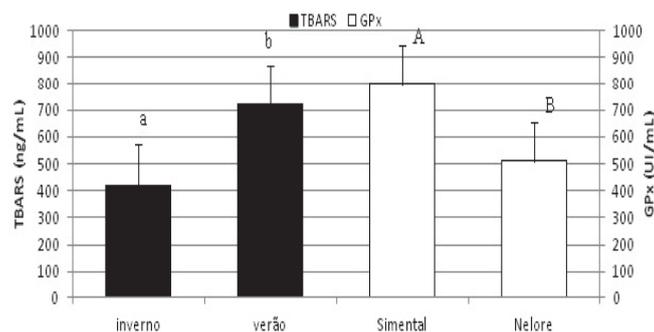
Sob condições tropicais, Nichi et al. (2006) observaram que touros da raça Simental durante o verão, apresentaram aumento de defeitos maiores nas células espermáticas em relação ao inverno, e esta ainda permanecia maior quando comparada com touros da raça Nelore (P = 0,0374), de acordo com a Figura 1. Ainda durante o verão, os touros Nelore apresentaram maior porcentagem de defeitos menores quando comparados com os animais Simental. Em relação à ROS observou-se que a atividade da enzima GSH-Px foi significativamente maior em sêmen de touros da raça Simental vs Nelore, sugerindo que mesmo em níveis mais elevados, essas enzimas eram incapazes de conter o estresse oxidativo, resultando assim em concentrações mais elevadas de TBARS (P=0,01). Este achado foi encontrado no sêmen dos touros Simental durante o verão (Figura 2), porém foi relacionado aos maiores níveis de ROS e não a uma menor capacidade antioxidante. Touros de raças zebuínas como o Nelore, por exemplo, possuem maior resistência à peroxidação lipídica causada pelo calor resultando em menor produção de ROS e menor aumento nos defeitos espermáticos.

**Figura 1:** Efeito da raça e estação do ano sobre a porcentagem de defeitos maiores, menores e totais em espermatozoides ( $P = 0,0374$ ).

Adaptado de Nichiet al. (2006).



**Figura 2:** Efeito de raça (Nelore vs Simental) e época do ano (inverno vs verão) na concentração seminal de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sobre a atividade enzimática da glutatiónperoxidase (GPx) em amostras de sêmen. Há diferenças para concentrações de TBARS ( $P = 0,01$ ).



**Tabela 1:** Aspectos qualitativos do ejaculado (média e desvio padrão) de touros *Bos indicus*, cruzados e *Bos taurus* com 18-30 meses de idade.

	<i>Bos indicus</i> (n=20)	Cruzados (n=28)	<i>Bos taurus</i> (n=26)
<b>Características seminais</b>			
Motilidade espermática (%)	55,0 ± 21,9	56,3 ± 16,8	50,2 ± 10,1
Defeitos maiores (%)	3,9 ± 2,9	19,2 ± 13,8	9,7 ± 4,9
Defeitos menores (%)	15,9 ± 20,1	11,1 ± 6,6	10,7 ± 14,5
Total de defeitos (%)	19,8 ± 22,4	30,2 ± 15,8	20,4 ± 14,5

Adaptada de Brito et al. (2004) ( $P > 0,05$ , anova de uma via, teste de médias ajustadas – LSD)

A relação genótipo, qualidade do sêmen e sazonalidade foi demonstrada por Koivisto et al. (2009) que avaliaram touros *Bos indicus* e *Bos taurus* ao longo de um período de 27 meses na região Sudeste do Brasil. O volume do ejaculado, a concentração espermática, o turbilhonamento, a motilidade progressiva, vigor e defeitos espermáticos morfológicos foram significativamente influenciados por estação e genótipo ( $P < 0,05$ ). De acordo com a tabela 2, a média do volume do ejaculado variou de 4,8 a 5,4 mL para *Bos indicus* e 6,3 a 6,8 mL para touros *Bos taurus*. Neste trabalho, o volume médio do ejaculado e a concentração espermática

## Efeitos das estações do ano nas características seminais

O estresse por calor afeta em menor magnitude touros de raças zebuínas em relação a touros de raças europeias. Durante a evolução das espécies, o gado zebu fixou genes que lhes proporcionam maior termotolerância ao estresse gerado pelo calor tanto fisiologicamente quanto celularmente (HANSEN, 2004).

Quando se compara as características anatómicas de gado zebuínico (*Nelore*), cruzados (5/8 ou 5/16 Charolês X Zebu) e gado taurino (*Angus*), observa-se que o zebu possui maior resistência a altas temperaturas ambientais, uma vez que estudos mostram a relação entre o comprimento da artéria e o volume testicular serem maior para *Nelore*, intermediário para cruzado e menor para *Angus* (BRITO et al., 2004). Essa relação possibilita maior eficiência na termorregulação testicular. Destarte, a qualidade do sêmen se deteriora mais severamente em touros cruzados e taurinos do que em zebuínos quando expostos a altas temperaturas ambientais (BRITO et al., 2004, Tabela 1).

média foi maior em *Bos taurus* ( $P < 0,05$ ), condizente com os achados de Brito et al. (2002). O turbilhonamento foi significativamente maior nos touros *Bos indicus* para cada estação. A porcentagem média de espermatozoides móveis progressiva foi significativamente maior em *Bos indicus* no outono e verão. Entretanto, os valores mais elevados da motilidade foram descritos no inverno para os dois genótipos. Por fim os valores médios do vigor foram maiores nos *Bos indicus* durante o verão.

**Tabela 2:** Variação sazonal na qualidade espermática avaliada durante um período de 27 meses em cinco touros *Bos indicus* (n = 1095 ejaculados) e seis touros *Bos taurus* (n = 1463 ejaculados)

	Genótipo	Estações do ano			
		Inverno	Outono	Verão	Primavera
Volume (mL)	<i>B. indicus</i>	4,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,2 ± 0,2
	<i>B. taurus</i>	6,6 ± 0,1	6,3 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,8 ± 0,2
Conc. Esp. (x10 <sup>6</sup> /mL)	<i>B. indicus</i>	1423,8±18,1 <sup>c,A</sup>	1458,6±22,9 <sup>b,c,A</sup>	1613,8±34,0 <sup>a,A</sup>	1547,7±29,3 <sup>a,b,A</sup>
	<i>B. taurus</i>	1190,9± 15,0 <sup>b,B</sup>	1306,6± 19,5 <sup>a,B</sup>	1209,5±33,7 <sup>a,b,B</sup>	1202,2± 29,1 <sup>b,B</sup>
Turb. (0-5)	<i>B. indicus</i>	3,3 ± 0,1 <sup>A</sup>	3,3± 0,1 <sup>A</sup>	3,4± 0,1 <sup>A</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>A</sup>
	<i>B. taurus</i>	3,0± 0,04 <sup>a,B</sup>	3,2± 0,1 <sup>a,B</sup>	2,5± 0,1 <sup>c,B</sup>	2,8± 0,1 <sup>b,B</sup>
Mot.P. (%)	<i>B. indicus</i>	58,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	56,8± 0,4 <sup>a,b</sup>	56,9± 0,5 <sup>a,b,A</sup>	56,5± 0,5 <sup>b,A</sup>
	<i>B. taurus</i>	58,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	56,7± 0,5 <sup>c</sup>	51,1± 0,7 <sup>d,B</sup>	53,7± 0,3 <sup>a,B</sup>
Vigor (0-5)	<i>B. indicus</i>	3,9 ± 0,03 <sup>A</sup>	4,0 ± 0,04	4,0 ± 0,04 <sup>A</sup>	4,0± 0,04 <sup>A</sup>
	<i>B. taurus</i>	4,0± 0,03 <sup>a,B</sup>	4,0± 0,03 <sup>a</sup>	3,8, ± 0,04 <sup>b,B</sup>	3,8± 0,04 <sup>b,B</sup>

Adaptada de Koivisto et al.(2009).Os valores são apresentados como média ± desvio padrão.

Conc.Esp.- Concentração espermática; Turb.- Turbilhonamento; Mot P. – motilidade progressiva

Diferenças significativas (P<0,05) na linha são indicadas por letras minúsculas e na coluna por letras maiúsculas

Segundo Koivisto et al. (2009), quanto à morfologia espermática, observou-se que os touros de origem europeia apresentaram maior proporção de defeitos maiores para todas as estações. Um aumento significativo foi encontrado durante o verão para ambos os genótipos (P<0,05). Os defeitos de cabeça, gota citoplasmática proximal ou distal e cabeças isoladas foram significativamente maiores no verão, e os defeitos de cauda não apresentaram variação entre as estações. No sudeste do Brasil, local desse experimento, o clima é caracterizado no inverno por baixas temperaturas e umidade, ou seja, frio e seco. Já no verão, há aumento da temperatura com consequente aumento da umidade do ar, causada pelas chuvas.

Ainda de acordo com o trabalho de Koivisto et al. (2009), verificaram a motilidade média no sêmen fresco variou de 56,5% (verão) para 58,2% (inverno) e 51,1% (verão) para 58,5% (inverno), em *B. indicus* e *B. taurus*, respectivamente os valores mais elevados foram encontrados no inverno. Esse resultado torna evidente que os taurinos possuem menor resistência ao calor visto que apresentam menor motilidade durante o verão. Contudo, adaptações específicas anatômicas desenvolvidas por raças de origem zebuínas para ambientes de altas temperaturas, melhoram o resfriamento testicular e, por conseguinte a qualidade de sêmen. Estes achados conferem com os de Silva et al. (2009b) que relatam que touros europeus talvez sejam mais susceptíveis a umidade que os zebuínos e que em ambos os genótipos o ejaculado obtido nos meses mais úmidos do ano apresentaram menor qualidade. Tanto touros de raças zebuínas quanto os taurinos, avaliados em centrais de inseminação artificial apresentaram mais ejaculados congelados na estação seca do que na estação chuvosa (Anchieta et al., 2005). Em contrapartida, com a maioria dos trabalhos realizados em ambientes tropicais, Souza (2012) verificou que o primeiro e o quarto trimestre do ano foram os que apresentaram maior produção e maior qualidade seminal mesmo sendo meses mais quentes, com maior umidade e em períodos chuvosos.

Karoui et al. (2011) avaliaram dados de 42.348 ejaculados coletados de 1990-2007 em 502 touros da raça Holandesa provenientes de um centro de inseminação artificial

espanhol (Aberekin, S.A.). Eles observaram que as características de motilidade e os indicadores de viabilidade espermática, foram os mais afetados pelas condições ambientais.

A fim de avaliar os efeitos da estação do ano sobre as características seminais de touros, Snoj et al. (2013) avaliaram 71.983 ejaculados coletados de touros de quatro raças – Pardo Suíço, Limousin, Holandês e Charolês – ao longo de 31 anos. Os dados foram recolhidos da Central de Coleta e Processamento de Sêmen Preska, na Eslovenia. Os resultados deste trabalho revelaram que a concentração espermática não variou significativamente durante as estações, já o volume do ejaculado e a produção total de espermatozoides foram influenciados pela sazonalidade e demonstraram melhores resultados no verão, em que, considerando as características climáticas do país, a temperatura nesta estação do ano é mais amena quando comparada a países tropicais. Os autores ressaltaram ainda que são fortemente confirmados os efeitos sazonais sobre a produção espermática em raças europeias.

Outros pesquisadores com o mesmo intuito avaliaram os dados de sêmen de 147 touros (3.625 ejaculados) e 127 touros (3.654) nos anos 2000 e 2001, respectivamente, oriundos de Centros de Coleta de Sêmen Austríacos. A temperatura, neste estudo, apresentou efeitos importantes, porém inconsistentes sobre a produção de sêmen e espermatozoides. Entretanto, foi destacado que as temperaturas ambientes no intervalo de 5-15°C foram ótimas para a produção espermática (Fuerst-Waltl, et al., 2006).

Vilakazi e Webb (2004) estudaram a interação entre a época do ano e as características morfológicas espermáticas de uma população de 271 touros no Sul da África mantidos em um centro de inseminação artificial. O sêmen foi coletado por meio de uma vagina artificial em todas as quatro estações do ano. As amostras foram avaliadas para a porcentagem de defeitos. A porcentagem de defeitos maiores foram 20,3 ± 1,3%, 15,3 ± 1,9%, 12,5 ± 2,0% e 11,5 ± 2,0% (P=0,01), respectivamente para verão, outono, inverno e primavera. Defeitos espermáticos maiores, como gota proximal e cabeça piriforme diferiu significativamente entre as estações. Os melhores resultados foram observados na primavera e no

inverno do que no verão e no outono.

Segundo os resultados de Koivisto et al. (2009), quanto à congelabilidade do sêmen, foram desprezados ejaculados que apresentavam motilidade progressiva <60%, defeitos maiores >20% ou defeitos totais >30%. Touros *Bos taurus* tiveram 248 ejaculados rejeitados em 1.463 representando 17% e touros *Bos indicus* tiveram 21 ejaculados descartados em um total de 1.095 representando 1,9% evidenciando uma qualidade seminal muito superior nas raças zebuínas. Na pós-descongelação, 52% dos ejaculados congelados nos touros de raça zebuína apresentaram qualidade satisfatória para uso em inseminação artificial comparados com 40,6% dos ejaculados congelados dos *Bos taurus*. A congelabilidade sofreu influência das estações do ano, pois a maior taxa de descarte ocorreu durante o verão ( $P<0,05$ ).

### Efeito da sazonalidade no perfil proteico do plasma seminal

A biologia molecular possibilitou o uso de novas ferramentas de trabalho a fim de incrementar certas caracte-

terísticas reprodutivas de um animal, utilizando marcadores bioquímicos em fluidos orgânicos permitindo uma seleção de genótipos superiores. Os perfis eletroforéticos do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica em casos de infertilidade de touros (MANJUNATH; SAIRAM, 1987; RONCOLETTA, 1999). Várias proteínas de pesos moleculares diferentes já foram identificadas no plasma seminal bovino e a frequência de observação destas relacionadas com as estações do ano.

Chacur; Castilho; Guaberto (2011) investigaram a influência da sazonalidade no Brasil sobre as características seminais e constituição proteica do plasma seminal de touros da raça Tabapuã criados extensivamente. Para tal, consideraram a estação seca, compreendida entre os meses de maio a julho, caracterizada por um inverno frio e seco e a estação chuvosa compreendida entre os meses de outubro a dezembro constituindo um verão quente e chuvoso. Foi encontrada diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre estações para as características: vigor espermático, defeitos menores e defeitos totais (Tabela 3).

**Tabela 3:** Médias das características do sêmen na estação seca (ES - maio e julho) e chuvosa (EC - outubro e dezembro), em touros da raça Tabapuã criados extensivamente.

Estação	Volume (ml)	Mot (%)	Vigor (0-5)	Def M (%)	Def m (%)	Def T (%)
ES	3,89 a	56,00 a	2,09 a	19,05 a	14,99 b	25,14 b
EC	5,51a	49,61 a	1,76 b	22,93 a	20,84 a	32,81 a

Letras diferentes na coluna indicam valores diferentes pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ )

Mot – motilidade; Def. M – defeitos maiores; Def. m – defeitos menores; Def. T – defeitos totais.

Adaptado de Chacur; Castilho; Guaberto (2011).

Esses resultados sugerem que o sêmen produzido durante a estação seca, apresenta melhor qualidade refletindo em melhores condições para processamento e congelamento deste.

Touros das raças Nelore e Holandesa apresentaram maior vigor espermático na estação chuvosa (OLIVEIRA; DUARTE; NASCIMENTO, 2006), diferindo dos resultados encontrados por Chacur, Castilho e Guaberto (2011). Várias proteínas do plasma seminal bovino têm influência na congelabilidade do sêmen (RONCOLETTA, 1999). A presença ou ausência de proteínas específicas na membrana dos espermatozoides pode alterar a fertilidade do ejaculado de um touro. O processo de criopreservação provoca alterações em algumas moléculas de proteína que influenciam no metabolismo e, conseqüentemente, nas características seminais (RONCOLETTA et al., 2006). Por meio da análise das proteínas do plasma seminal Chacur, Castilho e Guaberto (2011) verificaram a presença de alguns polipeptídeos, os quais tiveram sua frequência relacionada à sazonalidade.

Na seca, estiveram presentes as bandas proteicas de nove kDa e 12 kDa pertencentes ao grupo das espermadesinas e apareceram em 90,90% e 63,63% das amostras, respectivamente. Outra proteína encontrada por Chacur, Castilho e Guaberto (2011) nessa estação foi a de 55k Da presente em 63,63% dos touros, essa pertence ao grupo das osteopontinas que foi identificada como uma das proteínas de fertilidade e alta congelabilidade em touros (MOURA; KOC; CHAPMAN 2006). As fontes primárias da osteopontina no touro são as vesículas seminais e as ampolas (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1999). Sugere-se que a relação desta

proteína com a congelabilidade do sêmen pode ser atribuída à modulação da função celular da membrana plasmática do espermatozóide, contribuindo, assim, para a proteção da mesma no processo da criopreservação (JOBIM et al., 2002; JOBIM; GREGORY; MATTOS, 2009).

Na estação chuvosa a proteína de 6k Da foi observada em 90,90% dos touros e na estação seca em 81,81% (CHACUR; CASTILHO; GUABERTO, 2011). Esta proteína possui atividade antimicrobiana, capta íons  $Ca^{2+}$  para os espermatozoides no epidídimo e também inibe a proliferação de linfócitos (WEMP; WAGNER; KAMMER, 1990). Outro polipeptídeo observado nessa estação no mesmo trabalho foi a proteína de 66 kDa chamada albumina, que atua colaborando com a nutrição celular da linhagem espermato gênica, além de participar de modificações na permeabilidade da membrana espermática. Deste modo, uma maior concentração de albumina no plasma seminal é associada a um ejaculado de alta congelabilidade (JOBIM; GREGORY; MATTOS, 2009). A albumina é uma proteína conhecida por induzir o efluxo de colesterol, atuando como aceitadora de colesterol e é frequentemente usada para induzir a capacitação do espermatozóide in vitro (CHIU et al., 2005).

Uma banda de 17 kDa foi observada em 63,63% dos touros na estação chuvosa e 27,27% na seca em pesquisa desenvolvida por Chacur, Castilho e Guaberto (2011). Essa banda proteica pertence ao grupo Proteína Sérica Bovina (BSP) e sua presença pode estar ligada a ocorrência de modificações na membrana dos espermatozoides durante o congelamento. Isto leva à capacitação prematura do espermatozóide após descongelação, uma vez que após a criopre-

servação há diminuição de 70-80% dessas proteínas ligadas à membrana espermática (NAUC; MANJUNATH, 2000). Se o sêmen não for diluído, ele será continuamente exposto a altas concentrações das BSP, conseqüentemente a remoção de lipídios da membrana espermática é contínua, resultando na diminuição da resistência espermática ao choque térmico e a congelação (MANJUNATH et al., 2007). Quem controla essa ação das BSP e está presente em geral nos diluidores é a gema do ovo. Esses achados conferem com os relatos de Chacur, Castilho e Guabert (2011) no qual as proteínas BSP encontradas em maior quantidade na estação chuvosa estariam relacionadas com a queda na fertilidade dos touros.

Outra proteína também observada foi a de 26 kDa presente em 100% dos animais na estação chuvosa e em 54,54% na seca (CHACUR; CASTILHO; GUABERTO, 2011). Este achado corresponde com o observado por Jobim et al. (2004) em que esta proteína também esteve presente em 100% das amostras dos reprodutores de baixa congelabilidade. Esta banda proteica foi sugerida como indicativa de baixa congelabilidade do sêmen bovino e embora ainda não tenha sido identificada, ela poderia corresponder à prostaglandina D sintase tipo lipocalina, pelo peso molecular e ponto isoelétrico aproximado, ou seja, ponto em que há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína.

### Considerações Finais

Diante do observado, pode-se afirmar que touros da raça zebuína possuem maior resistência ao estresse tanto térmico (aspectos qualitativos do ejaculado) quanto oxidativo (mensuração da glutatona peroxidase e do ácido tiobarbitúrico presentes no plasma seminal). A maior resistência conferida por essa espécie à peroxidação lipídica causada pelo calor e a uma termorregulação testicular mais eficiente resulta em menor produção de ROS e em menor percentual de anormalidades nas células espermáticas em relação aos touros europeus. Destarte, touros *Bos taurus* não apresentam um bom desempenho durante períodos mais quentes do ano devido a menor eficiência da termorregulação o que leva a questionar se a relação custo-benefício de aproveitamento do sêmen para criopreservação justifica o processamento do mesmo pelas Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen nestes períodos. Assim, a coleta de sêmen deve ser realizada de preferência na primavera ou no inverno. O verão não é a época ideal uma vez que o ejaculado não apresenta a melhor qualidade devido a altas temperaturas associada à alta umidade.

Este estudo é importante para uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva dos touros e oferece relevantes informações para uma melhor coleta de sêmen de acordo com as estações do ano.

### Referências

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.

ANCHIETA, M. C. et al. Descarte e congelabilidade do

sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 196-204, 2005.

BARROS, C. M. Q. et al. Efeitos da diminuição do fluxo sanguíneo testicular nas temperaturas escrotal superficial, escrotal subcutânea, intratesticular e intravascular em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 49-54, 2011.

BENTLEY, G. E.; TSUTSUIC, K.; KRIEGSFELDB, L. J. Recent studies of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in the mammalian hypothalamus, pituitary and gonads. **Brain Research**, v. 1364, p. 62-71, 2010.

BILODEAU, J. F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BRITO, L. F. C. et al. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 181-190, 2002.

BRITO, L. F. C. et al. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511-528, 2004.

BROUWERS, J. F.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology Reproduction**, v. 60, p. 454-460, 1999.

CHACUR, M. G. M.; CASTILHO, A. M. N.; GUABERTO, L. M. Influência das estações seca e chuvosa no plasma seminal (SDS-PAGE) e características do ejaculado de touros *Bos taurus indicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1565-1574, 2011.

CHIU, P. C. N. et al. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25580-25589, 2005.

FUERST-WALTL, B. et al. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 27-37, 2006.

FUJII, J. et al. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian Journal Andrology**, v. 5, p. 231-242, 2003.

- GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 1, n. 91, p.14-22, 1991.
- HAMANO, K. et al. Spermatogenesis in immature mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 6, p. 139-149, 2007.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, p. 349-360, 2004.
- HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; GALINA, C. S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus – Ibagé frente a regeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 523-526, 1999.
- JOBIM, M. I. M. et al. Albumin and osteopontin-proteins seminal plasma related with semen freezability. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 26, n. 2, p. 296-305, 2002.
- JOBIM, M. I. M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, p. 255-266, 2004.
- JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 25-31, 2009.
- KAROUI, S. et al. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 28-38, 2011.
- KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H. Scrotal and testicular thermoregulation in the bull. **Theriogenology**, p. 67-72, 1993.
- KASTELIC, J. P.; COOK R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-261, 1997.
- KOIVISTO, M. B. et al. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction Domestic Animal**, v. 44, p. 587-592, 2009.
- LENZI, A. et al. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers Bioscience**, v. 5, p.1-15, 2005.
- MAJIC, B. I. et al. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 423-431, 2012.
- MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress and male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, p. 357-367, 2009.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic protein (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Journal Biochem**, v. 241, p. 685-692, 1987.
- MANJUNATH, P. et al. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Spermatology**, v. 65, p. 217-228, 2007.
- MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 201-211, 2006.
- MORAES, D. A. E. F. et al. Variação anula de hormônios tireoidianos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 538-545, 2008.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.
- NICHI, M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.
- OLIVEIRA, K. M.; DUARTE, A. M.; NASCIMENTO, M. R. B. M. Influência das estações seca e chuvosa sobre as características seminais de touros das raças *Nelore*, Gir e Holandês criados à pasto. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 145-151, 2006.
- PAN, Y. S. Variation in hair characters over the body in Sahiwal, Zebu and Jersey cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v. 15, p. 346-356, 1964.
- PEZZI, C.; ACCORSI, P. A.; GOVONI, N. Deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 152-158, 2003.
- RAIJMAKERS, M. T. M. et al. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 69-72, 2003.
- RONCOLETTA, M. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal bovino relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros**. 1999. 109

f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

Recebido em: 21.10.2013

Aceito em: 20.03.2015

RONCOLETTA, M. et al. Fertility-associated proteins in *Nelore* bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 77-87, 2006.

SETCHELL, B. P.; VOLGMAYR, J. K.; HINKS, N. T. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 24, p. 81-89, 1971.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers Bioscience**, p.78-86, 1996.

SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. p.16-26.

SILVA, A. R. et al. Efeito da idade e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças europeias e zebuínas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1218-1222, 2009a.

SILVA, A. R. et al. Abordagem multivariada envolvendo características físicas e morfológicas de sêmen bovino, idade dos touros e época de colheita de sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1223-1228, 2009b.

SNOJ, T.; KOBAL, S.; MAJDIC, G. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. **Theriogenology**, v. 79, p. 847-852, 2013.

SOUZA, R. R. C. P. **Efeitos ambientais e de grupos genéticos sobre características de produção de sêmen em touros mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*)**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2012.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

VILAKAZI, D. M.; WEBB, E. C. Effect of age and season on sperm morphology of Friesland bulls at an artificial insemination Centre in South Africa. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, n. 1, p. 62-69, 2004.

WEMP, F.; WAGNER, S.; KAMMER, H. V. D. Seminal plasmin the major basic protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of the seminal vesicle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 34, n. 2, p. 260-262, 1990.

WIHELM FILHO, D. et al. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 199-210, 2004.