



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO SOCIEDADE, NATUREZA E
DESENVOLVIMENTO

EFEITOS CLIMÁTICOS SOBRE PARÂMETROS SEMINAIS, MORFOMÉTRICOS E
FISIOLÓGICOS EM BÚFALOS NA AMAZÔNIA

SÂMIA RUBIELLE SILVA DE CASTRO

Santarém/PA
MAIO/2017

SÂMIA RUBIELLE SILVA DE CASTRO

EFEITOS CLIMÁTICOS SOBRE PARÂMETROS SEMINAIS, MORFOMÉTRICOS E
FISIOLÓGICOS EM BÚFALOS NA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Wiliam Gomes Vale

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento da Universidade Federal do Oeste do Pará, para fins de obtenção do título de Doutor.

Santarém/PA
MAIO/2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- C359e Castro, Sâmia Rubielle Silva de
Efeito do meio ambiente sobre alguns parâmetros seminais, morfométricos e fisiológicos em búfalos. / Sâmia Rubielle Silva de Castro. – Santarém, Pa, 2017.
115fls.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientador William Gomes Vale
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pro-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação Doutorado Sociedade, Natureza e Desenvolvimento.
1. Amazônia. 2. Búfalos. 3. Meio ambiente. 4. Parâmetros reprodutivos. 5. Sêmen. I. Vale, William Gomes, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 636.293

SÂMIA RUBIELLE SILVA DE CASTRO

EFEITOS CLIMÁTICOS SOBRE PARÂMETROS SEMINAIS, MORFOMÉTRICOS E
FISIOLÓGICOS EM BÚFALOS NA AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Sociedade Natureza e
Desenvolvimento da Universidade Federal
do Oeste do Pará, para fins de obtenção do
título de Doutor.

Prof. Dr. Wiliam Gomes Vale

Data da Aprovação: Santarém-PA, 10 de maio de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. WILLIAM GOMES VALE
PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr. ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO
TITULAR 1 - UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

Profª. Dra. ADRIANA CAROPREZO MORINI
TITULAR 2 - UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

Profª. Dra. ALANNA DO SOCORRO LIMA DA SILVA
TITULAR 3 - UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

Prof. Dr. LUIS GABRIEL ALVES CIRNE
TITULAR 4 - UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

Prof. Dr. HAROLDO FRANCISCO LOBATO RIBEIRO
TITULAR 5 - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

A minha mãe Solenilda Silva de Castro e meus avós José Augusto (*in memoriam*) e Solange Silva por toda dedicação, muito amor, força e apoio em todos os sentidos.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por me abençoar grandemente e guiar meus passos em todos os momentos.

A minha mãe Solenilda e avós Solange e José Augusto (*in memoriam*) pelo incentivo, apoio e por fazerem de mim uma pessoa melhor, ao me repassarem os mais sábios ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. William Gomes Vale, por sua constante orientação, enorme dedicação a esse projeto, com muita paciência e ensinamentos imprescindíveis para minha vida profissional. E por cuidar de seus orientados como um pai. Obrigada por tudo!

Aos professores Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino, Dra. Adriana Caroprezo Morini, Dra. Alanna do Socorro Lima da Silva, colegas de profissão e do IBEF que sempre estiveram apoiando o projeto. Muitas vezes eram as atitudes de vocês perante os problemas que surgiam que me ajudava a não esmorecer. Obrigada pela amizade!

Aos professores Dr. Anderson Alvarenga de Moura Meneses; Dr. Bernhard Gregor Peregovich; Dra. Graciene Conceição dos Santos e Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro por valiosas contribuições na pesquisa e sugestões importantes que contribuíram para execução e conclusão do trabalho.

Ao Dr. Alexandre Rossetto Garcia que ainda na época de meu mestrado, abriu às portas para eu me encantar com a bubalinocultura e me especializar na área de reprodução. Os seus ensinamentos ficaram para minha vida profissional.

Ao bubalinocultor Josiel que cedeu os búfalos para o experimento, sempre muito disposto a ajudar.

Aos tratadores dos animais Maurício e, especialmente, ao Dilal, este que há mais de 30 anos trabalha com búfalos.

Ao meu amigo de profissão Tanael Azevedo, que não mediu esforços para me ajudar nas horas mais difíceis, mesmo de madrugada, iniciou o projeto comigo, ajudou a treinar estagiários, e ainda a buscar capim nas alagadas.

A todos os estagiários da UFOPA e FIT/ UNAMA pela grande contribuição, apoio e momentos de descontração durante as colheita de dados.

Aos funcionários da UFOPA que colaboraram de várias formas com o projeto, seja no transporte, vigilância, manutenção, por toda ajuda e muitos momentos alegres, pelo constante auxílio e disposição para a realização deste trabalho.

Aos técnicos da UFOPA Gilson e José Júnior por contribuírem com seus conhecimentos para execução das análises laboratoriais.

À UFOPA, que através do Curso de Pós-graduação Sociedade, Natureza e Desenvolvimento, pelos professores que puderam proporcionar minha formação e crescimento profissional; e técnicos do programa, em especial Euclides Araújo Ribeiro, que sempre nos auxiliou com muita competência.

A todos que de alguma maneira ajudaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

“No começo do Gênesis está escrito que **Deus criou o homem para reinar sobre os pássaros, os peixes, os animais domésticos e selvagens. Levou ao homem todos os animais, para que ele tivesse o privilégio de dar nome a eles.** Deus na sua grande sabedoria planejara a íntima relação entre os animais e o homem. Essa atitude foi para o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, porque assim, o fazendo, ninguém precisaria ensiná-lo a amar seu semelhante. Os animais têm sido utilizados pelo homem nas mais diferentes fases da civilização, como companhia, alimento, trabalho, transporte, lazer e, ainda, criados com caráter econômico na produção de carne, leite, ovos e mel, e até como produtos terapêuticos para o próprio homem. Em uma pequena troca, representando a eterna gratidão com os animais, a arte de curá-los, assim como a manutenção do seu bem estar gerou uma das mais belas ciências: a Medicina Veterinária. Grandes civilizações, como os egípcios e os gregos, tinham como símbolos mitológicos híbridos entre animais e formas humanas, dando-lhes o conceito de sagrado. Sábios eram! Na evolução da domesticação dos animais e na tentativa de produção e reprodução, as questões de bem-estar animal não são desconsideradas por este homem que ama os animais. Cabe-nos o discernimento entre as atitudes corretas e erradas com os animais, e termos para com eles a verdadeira compaixão, pois ela está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

Sâmia Rubielle Silva de Castro

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de variáveis climáticas sobre parâmetros de ejaculados de touros búfalos, da raça Murrah, criados em clima tropical úmido da Amazônia; bem como analisar parâmetros bioquímicos de frutose (Fru), albumina (Alb), proteína plasmáticas totais (PPT), cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg); avaliar alguns parâmetros fisiológicos, referentes a frequência cardíaca (FC), respiratória (FR), temperatura retal (TR) e temperatura superficial (TS); e analisar dados morfométricos de peso (P), circunferência escrotal (CE) e perímetro torácico (PT), ao longo dos períodos chuvoso e não-chuvoso da região amazônica. Foram selecionados cinco búfalos ($n = 5$), com média de idade $2,5 \pm 0,5$ anos e peso corporal de $450,0 \pm 35,5$ kg, dentre um grupo de 12 touros adultos, utilizando como critério, uma pré-avaliação, por meio de exame clínico e andrológico, como doadores de sêmen, escolhidos baseado na melhor qualidade dos ejaculados, colhidos pelo método de vagina artificial. O experimento foi conduzido no município de Santarém, Mesorregião do Baixo Amazonas, Oeste do Pará, na área do Parque de Exposições Agropecuárias do Sindicato Rural de Santarém, com os animais experimentais mantidos em regime de estabulação, separados em baias individuais e alimentados com capim *Echinochloa polystachya* (Canarana-de-pico) *ad libitum*, e suplementados com dois kg de ração comercial, composta por milho, soja e sorgo (com 16% de proteína bruta). Os animais tiveram acesso constante a água fresca e limpa, bem como sal mineral *ad libitum* em um cocho. O controle sanitário foi realizado de acordo com critérios pré-estabelecidos para a espécie. O período experimental foi dividido em período chuvoso (PCh), de fevereiro a maio, e período não-chuvoso (PnCh), de agosto a novembro de 2016. Os ejaculados foram colhidos duas vezes por semana ($n = 30$) por touro, 10 ejaculados no PCh e 20 ejaculados no período PnCh, totalizando ($n = 150$) amostras para análise. As avaliações físicas e morfológicas das amostras de sêmen foram realizadas com sêmen fresco, imediatamente após cada colheita. As análises imediatas pertinentes às características físicas e morfológicas dos ejaculados foram realizadas e corresponderam no PCh o volume de $3,4 \pm 2,0$ mL, turbilhonamento (movimento de massa) de $4,4 \pm 0,5$; motilidade de $80,4 \pm 5,6\%$; vigor de $4,4 \pm 0,4$; concentração de $657,300 \pm 237,865,1 \times 10^6$ sptz / mL; defeitos maiores de $9,0 \pm 2,6\%$; defeitos menores de $11,2 \pm 3,9\%$; defeitos totais de $20,2 \pm 5,3\%$ e integridade da membrana plasmática (IMP) de $84,8 \pm 5,6\%$, enquanto que no PnCh, os resultados foram de $4,0 \pm 2,1$ mL; movimento de massa de $3,0 \pm 1,0$; motilidade de $56,2 \pm 13,4\%$; vigor de $3,0 \pm 1,0$; concentração de $586,000 \pm$

291,925.9 x10⁶sptz / mL; defeitos maiores de 20,8 ± 9,9%; defeitos menores de 27,5 ± 6,3%; defeitos totais de 48,3 ± 9,3% e IMP de 57, 9 ± 12,4%. Observou-se diferença estatística (P<0,01) para os parâmetros movimento de massa, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e integridade da membrana plasmática entre os dois períodos. Dos parâmetros bioquímicos do sêmen, como frutose, albumina, cálcio e fósforo, apresentaram diferença estatística significativa entre os períodos (P<0,01), diferentemente de proteínas plasmáticas totais e albumina (P>0,01). Os dados médios para Fru, foram de 17,1 ± 5,6 mg/dL e 10,7 ± 5,6 mg/dL para o PCh e PnCh, respectivamente. Da mesma forma, no tocante aos outros componentes estudados, a relação entre as PPT foi de 1,6 ± 0,5 g/dL e 1,7 ± 0,6 g/dL; Alb 0,45 ± 0,1 g/dL e 0,3 ± 0,1 g/dL; Ca 20,6 ± 2,2 mg/dL e 19,6 ± 2,3 mg/dL; P 11,6 ± 4,6 mg/dL e 7,8 ± 4,5 mg/dL; Mg 2,6 ± 0,5 mg/dL e 2,7 ± 0,7 mg/dL, para o PCh e PnCh, respectivamente. Quanto aos dados de morfometria, como CE, PT e P, não apresentaram diferença significativa entre os períodos estudados (P>0,01). Dados para CE foram 28,32 ± 2,3 cm e 28,28 ± 1,8 cm; para o PT foram de 189,09 ± 14,28 cm e de 187,06 ± 11,05 cm; e para o P, que foram de 477,46 ± 112,6 Kg e 473,45 ± 84,48 Kg; no PCh e no PnCh, respectivamente. Dados de frequência cardíaca, temperatura superficial (cabeça, dorso, virilha e bolsa escrotal) diferiram estatisticamente entre os períodos (P<0,01). Entretanto, os dados referentes de FR e TR não diferiram entre os períodos (P>0,01). Os dados de FC foram de 54 ± 10,9 bpm e 48 ± 11,8 bpm; FR 22 ± 6,8 mpm e 23 ± 6,7; TR, de 38,3 ± 0,8 °C e 38,2 ± 0,8 °C; TS na região de cabeça (TSC) foram de 33,3 ± 2,5 °C e 36,2 ± 2,4 °C; na região do dorso (TSD) de 33,6 ± 2,1 °C e 35,1 ± 2,1 °C; na virilha (TSV) 32,3 ± 2,2 °C e 34,6 ± 2,2 °C; e bolsa escrotal (TSBE) 30,3 ± 2,0 °C e 32,3 ± 2,0°C, no PCh e PnCh, respectivamente. A hipótese do experimento foi validada visto que os parâmetros reprodutivos bubalinos, como turbilhamento, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e integridade de membrana plasmática, foram melhores no período chuvoso que no não-chuvoso, apresentando diferença significativamente entre os períodos. Os parâmetros bioquímicos do sêmen para frutose, cálcio e fósforo foram os que diferiram estatisticamente nas estações chuvosa e não-chuvosa, apresentando melhores resultados no período chuvoso. Os parâmetros fisiológicos que sofreram influência do período não-chuvoso, em comparação ao chuvoso foram frequência cardíaca e temperatura superficial, de cabeça, dorso, virilha e bolsa escrotal. Os dados morfométricos de circunferência escrotal, perímetro torácico e peso não variaram durante os períodos estudados.

Palavras-chave: Amazônia, Búfalo, Meio Ambiente, Parâmetros Reprodutivos, Sêmen.

ABSTRACT

The present study was undertaken with the objective of evaluating the influence of climatic variables on parameters of ejaculates of Murrah buffalo bulls raised in humid tropical Amazonian climate, with the specific objectives of analyze biochemical parameters of fructose (Fru), albumin (Alb), total plasmatic protein (TPP), calcium (Ca), phosphorus (P) and magnesium (Mg), evaluate some physiological parameters such as heart frequency (HF), respiratory frequency (RF), rectal temperature (RT) and superficial temperature (ST), and to analyze morphometric data of weight (W), scrotal circumference (SC) and thoracic perimeter (TP) during the rainy and non-rainy periods in Amazon region. Five buffaloes (n=5), average of age 2.5 ± 0.5 years and body weight 450.0 ± 35.5 kg were selected from a group of 12 adult bulls, using a pre-evaluation, through clinical and andrological examination, as donors of semen, chosen based on the best quality of the ejaculates, collected by the artificial vagina method. The experiment was carried out in the municipality of Santarém, Meso-region of Lower Amazonas, West of Pará State, in the área of the Agricultural Exposition Park of the Rural Syndicate of Santarém, with experimental animals kept in lairage regime, separated in individual stalls and fed with the grass *Echinochloa polystachya* (Canarana-de-pico) *ad libitum* and supplemented with two kg of a comercial feed, composed by corn, soy and sorghum (with 16% crude protein). The animals had constant access to fresh and clean water, as well as mineral salt *ad libitum* in a trough. The sanitary control was carried out according to pre-established criteria for the species. The experimental period was divided into two phases: rainy season (RS), from February to May, and non rainy season (nRS), from August to November 2016. The ejaculates were collected twice a week (n=30) per bull, namely 10 ejaculates in the RS and 20 ejaculates in the nRS period, totaling (n=150) samples for analysis, The evaluations physical and morphological of the semen samples were performed with fresh semen, immediately after each collection. The immediate analyzes pertinent to the physical and morphological characteristics of the ejaculates were carried out and corresponded in the RS volume of 3.4 ± 2.0 mL; mass activity of 4.4 ± 0.5 ; motility of $80.4 \pm 5.6\%$; vigour of 4.4 ± 0.4 ; concentration of $657.300 \pm 237.865,1 \times 10^6$ sptz / mL; major defects of $9.0 \pm 2.6\%$; minor defects of $11.2 \pm 3.9\%$; total defects 2of $0.2 \pm 5, 3\%$ and sperm plasma membrane integrity (SPMI) $84.8 \pm 5.6\%$, where as in the nRS, the results were 4.0 ± 2.1 mL; mass activity of 3.0 ± 1.0 ; motility of $56.2 \pm 13.4\%$; vigour of 3.0 ± 1.0 ; concentration of $586,000 \pm 291,925.9 \times 10^6$ sptz / mL; major defects of $20.8 \pm 9.9\%$; minor defects of $27.5 \pm 6.3\%$; total defects $48.3 \pm 9.3\%$ and SPMI of $57. 9 \pm 12.4\%$. Furthermore, it was observed a

statistical difference ($P < 0,01$) for the parameters mass activity, motility, vigour, major defects, minor defects, total defects and sperm plasma membrane integrity between the both periods. The biochemical parameters of semen, fructose, albumin, calcium and phosphorus presented a statistical significant difference between both periods ($P < 0,01$), unlike total plasma proteins and albumin ($P > 0,01$). The mean data for Fru were 17.1 ± 5.6 mg/dL and 10.7 ± 5.6 mg/dL for RS and nRS, respectively. Likewise, in relation to the other components studied, the ratio between a TPP 1.6 ± 0.5 g/dL and 1.7 ± 0.6 g/dL, to Alb 0.45 ± 0.1 g/dL and 0.3 ± 0.1 g/dL, Ca 20.6 ± 2.2 mg/dL and 19.6 ± 2.3 mg/dL, P 11.6 ± 4.6 mg/dL and 7.8 ± 4.5 mg/dL, Mg 2.6 ± 0.5 mg/dL and 2.7 ± 0.7 mg/dL, for RS and nRS, respectively. The morphometry data, such as SC, TP and W, did not present any significant difference between both the studied periods ($P > 0,01$). the data for SC were 28.32 ± 2.3 cm and 28.28 ± 1.8 cm; for the TP were 189.09 ± 14.28 cm and 187.06 ± 11.05 cm; and for W, which were 477.46 ± 112.6 kg and 473.45 ± 84.48 kg; not RS and not nRS, respectively. The data on heart frequency, superficial temperature (head, back, groin and scrotal pouch) showed statistical difference between both periods ($P < 0,01$). However, the relative data, for RF and TR did not show any difference between both periods ($P > 0,01$). The HF data were 54 ± 10.9 bpm and 48 ± 11.8 bpm; RF 22 ± 6.8 mpm and 23 ± 6.7 ; RT, 38.3 ± 0.8 °C and 38.2 ± 0.8 °C; ST, in the head region (STH) were 33.3 ± 2.5 °C and 36.2 ± 2.4 °C; in the back region (STB) 33.6 ± 2.1 °C and 35.1 ± 2.1 °C; in the groin (STG) 32.3 ± 2.2 °C and 34.6 ± 2.2 °C; and scrotal pouch (STS) 30.3 ± 2.0 °C and 32.3 ± 2.0 °C, RS and nRS, respectively. The biochemical parameters of the semen for fructose, calcium and phosphorus were those that differed statistically in the rainy and non-rainy seasons, presenting better results in the rainy season. The physiological parameters that were influenced by the non-rainy period, compared to the rainy season were heart rate and surface temperature, of head, back, groin and scrotal pouch. The morphometric data of scrotal circumference, thoracic perimeter and weight did not vary during the periods studied.

Keywords: Amazon, Buffalo, Environment, Reproductive Parameters, Semen

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Alb	- Albumina
CE	- Circunferência Escrotal
CEBRAN	- Central de Biotecnologia da Reprodução Animal
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FCAP	- Faculdades de Ciências Agrárias do Pará
FAO	- Food and Agriculture Organization
FC	- Frequência Cardíaca
FIV	- Fertilização <i>in vitro</i>
FR	- Frequência Respiratória
Fru	- Frutose
GEE	- Generalized Estimation Equation
GLM	- Generalized Linear Model
GPC	- Glicerilfosforilcolina
IA	- Inseminação Artificial
IAN	- Instituto Agrônomo do Norte
IATF	- Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IICA	- Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura
IMP	- Integridade de membrana plasmática
kDa	- Kilodaltons
NAD	- Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P	- Peso
PCh	- Período Chuvoso
PnCh	- Período Não-Chuvoso
Proc Mixed	- Procedure Mixed
PT	- Perímetro Torácico
ONG	- Organização Não-Governamental
SAS	- Statistical Analysis Systems
TR	- Temperatura Retal
TS	- Temperatura Superficial
TSC	- Temperatura Superficial de Cabeça
TSD	- Temperatura Superficial de Dorso
TSV	- Temperatura Superficial de Virilha
TSBE	- Temperatura Superficial de Bolsa Escrotal
UFOPA	- Universidade Federal do Oeste do Pará
UFPA	- Universidade Federal do Pará
UNESCO	- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.

LISTA DE SÍMBOLOS

bpm	- Batimento por minuto
°C	- Graus Celsius
Ca	- Cálcio
Cm	- Centímetro
g/dL	- Grama por decilitro
Mg	- Magnésio
mg/dL	- Milígrama por decilitro
Mpm	- Movimento por minuto
m.s-1	- Metro por segundo
P	- Fósforo
PPT	- Proteínas plasmáticas totais
Rpm	- Rotação por minuto
W/m ²	- Watts por metro quadrado

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Foto 1	Touro bubalino (<i>Bubalus bubalis</i>) doador de sêmen, pertencente ao rebanho experimental, proveniente da Messorregião do Baixo Amazonas (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	39
Foto 2	Imagem fotográfica de microscopia óptica durante avaliação de sêmen bubalino, em aumento de 100x (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	41
Foto 3	Imagem fotográfica de microscópio de contraste de fase (Leitz, Germany). (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	42
Foto 4	Imagem fotográfica de microscopia de contraste de fase (Leitz, Germany) com aumento total de 1000x, sendo projetada em computador acoplado ao equipamento. (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	43
Foto 5	Imagem fotográfica de microscopia de contraste de fase de espermatozoides bubalinos, em aumento de 1000x. No detalhe, espermatozoide normal (N) e espermatozoide com gota protoplasmática proximal (GPP) (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).....	44
Figura 1	Messorregião do Baixo Amazonas. Estado do Pará. Brasil.....	23
Figura 2	Efeitos do estresse sobre a ingestão de alimentos e a reprodução. Adaptado de Squires, 2010.....	27
Figura 3	Mecanismo não-fosforilativo da formação da frutose. Adaptado de Mann e Lutwak-Mann, (1981).....	34
Figura 4	Distribuição de dados de temperatura (°C) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).....	48
Figura 5	Distribuição de dados de umidade relativa do ar (%) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).....	49
Figura 6	Distribuição de dados de pluviosidade (mm) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).....	49
Figura 7	Distribuição de dados de radiação solar (W/m ²) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).....	50

Figura 8	Distribuição de dados de velocidade do vento (m.s-1) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).....	50
Gráfico 1	Apresentação das médias de turbilhonamento e vigor de sêmen bubalino, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.....	53
Gráfico 2	Apresentação das médias de defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e defeitos totais (%) de sêmen bubalino, avaliados em microscopia de contraste de fase, , no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.....	56
Gráfico 3	Apresentação das médias das análises bioquímicas do plasma seminal para albumina (g/dL), proteínas plasmáticas totais (PPT) (g/dL), Magnésio (Mg) (mg/dL), fósforo (P) (mg/dL), frutose (mg/dL) e cálcio (Ca) (mg/dL) de sêmen bubalino, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.....	57
Gráfico 4	Apresentação das médias de circunferência escrotal (CE) (mm), perímetro torácico (PT) (mm) e Peso (Kg) de touros bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.....	58
Gráfico 5	Apresentação das médias de temperatura de superfície (TS) (°C) de testículos, virilha, dorso e cabeça e temperatura retal (°C) de touros bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Defeitos maiores e menores, segundo Blom (1973) quanto a morfologia espermática.....	43
Tabela 2	Apresentação das variáveis encontradas nas diferentes estações, no decorrer do presente estudo, com base nos dados obtidos pela Estação Meteorológica WS-GP1 (AT Delta-Devices Ltda, Cambridge, UK) em Santarém - Pará, entre março e novembro de 2016 (média \pm DP). O período chuvoso: março - junho; período não-chuvoso: julho a novembro de 2016.....	48
Tabela 3	Apresentação das características físicas e morfológicas de ejaculados bubalinos, no período chuvoso (março a maio) (n=50). Santarém, Pará, 2016.	51
Tabela 4	Apresentação das características físicas e morfológicas de ejaculados bubalinos, no período não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016.....	52
Tabela 5	Apresentação das características físicas e morfológicas médias de ejaculados bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016.....	54
Tabela 6	Apresentação da estatística descritiva comparativa para categorias de defeitos de espermograma bubalino, por métodos de microscopia de contraste de fase e coloração com eosina-nigrosina. Santarém, Pará. 2016.....	55
Tabela 7	Apresentação dos dados das análises bioquímicas do plasma seminal de bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016. PPT: proteínas plasmáticas totais; Ca: cálcio; P: fósforo; Mg: magnésio.....	56
Tabela 8	Apresentação dos parâmetros morfométricos médios, coletados semanalmente, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=125). Santarém, Pará, 2016. CE: Circunferência escrotal; PT: perímetro torácico; P: peso.....	57
Tabela 9	Apresentação dos parâmetros fisiológicos médios, antes das colheitas de sêmen de bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016. FC: Frequência cardíaca; FR: frequência respiratória; TR: temperatura retal; TS: temperatura superficial.....	59

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 O MEIO AMBIENTE AMAZÔNICO E A PRODUÇÃO ANIMAL.....	22
3.2 ESTRESSE TÉRMICO E A INFLUÊNCIA NA BUBALINOCULTURA.....	26
3.3 INFLUÊNCIA DO CLIMA NA MORFOMETRIA, RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS EM BÚFALOS.....	28
3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO EJACULADO BUBALINO.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	38
4.2 ANIMAIS E PERÍODO DO EXPERIMENTO.....	38
4.3 ASPECTOS ÉTICOS DO EXPERIMENTO.....	39
4.4 ANÁLISES SEMINAIS.....	40
4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS.....	46
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5. RESULTADOS.....	48
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
9. TRABALHOS PUBLICADOS E EM ANDAMENTO.....	96

1. INTRODUÇÃO

A criação de bubalinos é uma atividade econômica emergente. Essa informação é corroborada pelo intenso crescimento nas taxas de produção de carne (16,8%) e leite de bubalinos (40,0%) registrado nos últimos 10 anos pela Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2014a).

A espécie bubalina tem despertado interesse crescente nos pecuaristas na América Latina, por sua comprovada rusticidade e produtividade. O maior rebanho bubalino das Américas encontra-se no Brasil, e o Pará possui o maior contingente de búfalos do país, que corresponde a aproximadamente 42% do rebanho nacional. Segundo dados oficiais, o efetivo do rebanho bubalino no Pará é de 336.868 mil cabeças, cuja criação, abate, transformação e comercialização de produtos (carne, couro, leite e derivados) têm gerado contribuição substancial para o agronegócio do país e para o PIB do estado (IBGE, 2013). Já segundo a FAO (2014b) o contingente bubalino nacional é de 1.319.478 milhão de cabeças. Hoje a bubalinocultura no Brasil se modernizou e foi decisiva no processo de desenvolvimento de biotecnologias que colocaram o Brasil na vanguarda da produção mundial de conhecimentos nessa espécie.

Por ser um animal dócil, de fácil manejo, capaz de se adaptar a diferentes condições de biodiversidade e ecossistemas, faz com que o búfalo seja criado em mais de 100 países do mundo como nas altas regiões do Cáucaso e Balcãs, aos oásis dos desertos do norte da África e da Ásia, as regiões quentes e úmidas, do sudoeste da Ásia ao vale Amazônico (COCKRILL, 1974). Segundo Cockrill (1986) devido a sua versatilidade de adaptação a regiões alagadas, fazem com que o "*vale Amazônico seja considerado como o paraíso dos búfalos*". Além disso, o mesmo autor enfatizou que devido sua capacidade de converter eficientemente toda a biomassa e alimentos de baixo valor nutricional, abundantes durante todo o ano na região, em alimentos para a alimentação humana, tais como leite e carne, a um custo econômico bem inferior ao produzido por qualquer espécie doméstica, fazem do búfalo o animal ideal para esta região. Sua fantástica capacidade de sobreviver nas condições adversas das várzeas, mesmo quando estas encontram-se alagadas, onde nenhuma espécie de animal doméstico consegue sobreviver, o búfalo é o animal ideal para o desenvolvimento de uma pecuária "limpa", indispensável aos modernos processos de preservação ambiental e

certificação de produtos originários da produção animal moderna. Sua carne tem características organolépticas de sabor igual ou superior a maioria das espécies domésticas, por possuir, em especial, menores níveis de colesterol, mais fibra, mais proteínas, vitaminas e minerais. Além disso, devido a sua rusticidade, facilidade de manejo e força física, tem sido eleito em diferentes regiões do mundo, como o animal ideal para tração, substituindo com vantagens máquinas agrícolas, beneficiando as comunidades mais carente no meio rural, como no caso a mesoregião do Baixo Amazonas, onde a utilização de máquinas agrícolas são inacessíveis aos pequenos agricultores não só pelo preço exorbitante, como a inviabilidade de utilização rotineira (VALE et al., 2013).

Chega a causar surpresa o desconhecimento, a ignorância e o desprezo para com o búfalo, e a forma como é tratado a nível regional, por ter sido praticamente abandonado pelos órgãos públicos que deveriam fomentar a utilização deste animal de múltipla utilização, diferentemente de algumas raças de bovinos produtores de carne, que muito deixam a desejar quando comparado com as performances dos bubalinos. Tal aspecto vem redundando a um desinteresse gradual sobre essa espécie, que além do abandono por parte daqueles que deveriam apoiar o fomento e desenvolvimento da espécie, criaram possibilidades para o surgimento de pessoas e instituições diversas (ONGs) “alienígenas” que têm procurado denegrir a imagem desta fantástica espécie, considerada por organismo internacionais como a FAO, UNESCO, IICA dentre outras, como um animal apropriado para o desenvolvimento agropecuário harmonioso em especial nas comunidades de pequenos agricultores.

Sobre esse aspecto Vale et al. (2013) chamam a atenção para a diminuição da população bubalina na Mesoregião do Baixo Amazonas e o perigo que essa espécie corre o risco de até mesmo de ser extinto a nível regional. Sabemos que não é fácil a reversão desse quadro, como também não foi fácil, de início, a aceitação de raças zebuínas em outras regiões do Brasil, onde havia a predominância de gado europeu para a produção de leite e carne.

Vale salientar, que a produção de conhecimento sobre bubalinos no Estado do Pará e na Amazônia remonta à época do Instituto Agrônomo do Norte (IAN), mais precisamente desde 1939, quando este foi fundado. A primeira inseminação artificial (IA) em búfalos no Brasil e na América Latina foi realizada pela equipe da UFPA (Universidade Federal do Pará) e da FCAP (Faculdades de Ciências Agrárias do Pará) na década de 80, do século passado. Tal aspecto foi considerado um grande avanço para a bubalinocultura nas Américas, pelo fato de até então a congelamento do sêmen bubalino e o manejo reprodutivo da inseminação artificial nesta espécie, não ter sido realizada de forma eficaz no continente Americano. Face a este

progresso, foi possível a criação da CEBRAN (Central de Biotecnologia da Reprodução Animal) pela UFPA, hoje uma unidade de vanguarda na biotecnologia da reprodução dos animais domésticos no Brasil. Na região Oeste do Pará, a Universidade Federal Oeste do Pará (UFOPA) vem assumindo papel de vanguarda no estudo da bubalinocultura regional, entretanto será necessário uma ação pública e privada no sentido de remover os sofismas que pairam sobre a criação de búfalos a nível regional. Tentativas infrutíferas para implementar o estabelecimento de rebanhos leiteiros a base de animais europeus e até mesmo com os seus mestiços, tem se revelado um grande erro, posto que o manejo requer artificialismos antieconômicos e cuidados especiais que quando cessam se estabelece enfermidades e o definhamento dos animais, que são acometidos pela ação negativa imposta pelo clima tropical úmido regional, levando a uma perda de tempo e investimento. Este modelo inadequado deve ser substituído pelo búfalo, que além de se adaptar ao meio ambiente regional, é capaz de produzir leite, carne e trabalho a um custo inferior necessário para as outras raças de bovinos (VALE et al., 2002).

Entretanto, os produtores de bubalinos necessitam elevar o padrão genético de seus rebanhos, a fim de ofertar carne e leite de qualidade (VALE et al., 2013). Nesse contexto, o desenvolvimento e a utilização das biotécnicas da reprodução animal surgem como eixo central para aumentar de modo exponencial a capacidade de multiplicação de material genético superior e promover o melhoramento animal (OHASHI et al., 2003).

Somente através das biotécnicas da reprodução como a IA, FIV, que deverão ser adotadas como rotineiras, será possível se estabelecer um trabalho de melhoramento em bubalinos, voltados principalmente a produção leiteira. A introdução do sêmen de reprodutores bubalinos da raça Murrah de forma intensiva, e a seleção dos animais provenientes dessa ação, será a chave para o estabelecimento de uma pecuária regional através de búfalos leiteiros (CASTRO, 2010).

Assim sendo, o presente experimento visa analisar os efeitos climáticos sobre parâmetros seminais, morfométricos e fisiológicos de reprodutores bubalinos, do criatório regional amazônico, e como esta influência pode se desenvolver nos períodos chuvoso e não-chuvoso, ao longo do ano. Da mesma forma, visa traçar o perfil bioquímico do plasma seminal, bem como, alguns aspectos ligados a morfometria e fisiologia desta espécie. Portanto, o referido projeto também visa potencializar a integração de pesquisadores, maximização do uso de laboratórios e de rebanhos bubalinos regionais, além de desenvolver e

disseminar o uso de biotecnologias como ferramentas para o melhoramento genético animal, contribuindo para a geração de pesquisa científica e inovação tecnológica a nível regional.

Com os resultados obtidos no presente estudo, espera-se que os mesmos sejam posteriormente importantes para o estabelecimento de novas pesquisas, que possam mitigar o atual quadro de estagnação tecnológica em que se encontra a bubalinocultura a nível regional.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito climático sobre parâmetros seminais de touros bubalinos, durante período chuvoso e não-chuvoso na região amazônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Identificar possíveis fatores ambientais que possam interferir na qualidade do sêmen na estação chuvosa e não-chuvosa;

b) Comparar técnicas para análise de morfologia espermática, técnica de gota úmida com uso de microscopia de contraste de fase e técnica de coloração por eosina-nigrosina;

c) Analisar parâmetros bioquímicos relacionados a frutose, albumina, proteína plasmática total, cálcio, fósforo e magnésio, nas estações chuvosa e não-chuvosa;

d) Avaliar parâmetros fisiológicos, como frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal e temperatura superficial, durante o período chuvoso e não-chuvoso, previamente as colheitas de sêmen;

e) Avaliar dados morfométricos de peso corporal, circunferência escrotal e perímetro torácico, correlacionando-os no decorrer do presente experimento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O MEIO AMBIENTE AMAZÔNICO E A PRODUÇÃO ANIMAL

A Amazônia brasileira ocupa 57% do território nacional, 65% da Amazônia continental e 28% da América do Sul. Cerca de 70% dessa área, ou 3,37 milhões de km², constituem ecossistemas de florestas, formações não-florestais e áreas de campos nativos de savanas e de solos aluviais de várzea, com gramíneas e leguminosas. Na Amazônia brasileira vivem 21 milhões de habitantes ou 12% da população nacional, dos quais quatro milhões desenvolvem atividades no setor primário e 40% como mão-de-obra na produção animal (FEARNSIDE, 2005; LOURENÇO JÚNIOR e GARCIA, 2006; IBGE, 2011; VALE et al., 2013).

Quanto aos solos amazônicos, 92% são de baixa fertilidade natural ou distróficos, enquanto que cerca de 40 milhões de hectares (8%), são eutróficos, ou de elevada fertilidade, o que representa quase a totalidade da área utilizada para agricultura no país. Na terra firme, os solos de baixa fertilidade natural receberam incorporação de nutrientes, pelas cinzas da biomassa vegetal, no processo de formação da pastagem, que propicia elevada produção forrageira, nos primeiros anos. Depois, há declínio da produtividade da pastagem, pela redução da disponibilidade de nutrientes no solo, e as características físicas, químicas e mineralógicas, associadas ao manejo inadequado, influenciam no estabelecimento, manutenção, longevidade produtiva e sustentabilidade das pastagens. Os baixos níveis de matéria orgânica, além de fornecer nutrientes para a forrageira, facilitam as trocas minerais e aumentam a retenção de água, evitando perdas por lixiviação. Na maioria dos solos sob pastagem, a disponibilidade de nutrientes ainda é superior à encontrada sob a floresta original (LOURENÇO JUNIOR e GARCIA, 2006; 2008; VALE et al., 2013; NEVES et al. 2014).

Nas pastagens de áreas aluviais, em várzeas da Amazônia brasileira, predominam solos hidromórficos, principalmente inceptissolos, destacando-se glei húmico e pouco húmico. Esses solos resultam do acúmulo de sedimentos recentes, carreados e depositados nessas áreas, pelas inundações periódicas dos rios de água barrenta, como o Amazonas. Essa deposição anual, como ocorre na mesorregião do Baixo Amazonas, onde localiza-se Santarém, que pode ser observado na Figura 1, adaptado de Sheikh et al. (2006), faz com que esses ecossistemas sejam de elevada fertilidade. A qualidade da água dos rios que inundam

essas pastagens influencia na disponibilidade e no valor nutritivo das gramíneas, e depende dos sedimentos organo-minerais, como fonte de nutrientes. As águas do rio Solimões são mais ricas em substâncias inorgânicas que as de outros rios da Amazônia brasileira, por serem extremamente turvas e carregarem sedimentos provenientes dos solos férteis dos Andes, de 50 a 150 mg/L, e dão origem às várzeas, de elevada fertilidade, com pastagens abundantes (PIEIDADE et al., 2005; LOURENÇO JUNIOR e GARCIA, 2008; VALE et al. 2013).

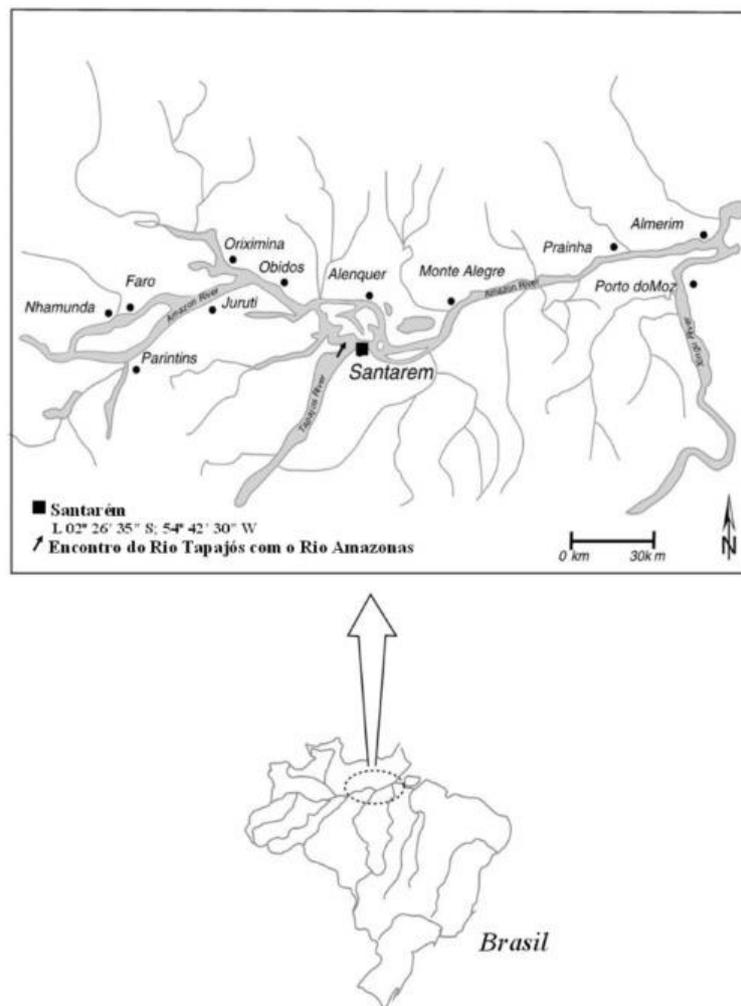


Figura 1. A mesorregião do Baixo Amazonas, Estado do Pará, Brasil.

Da Amazônia brasileira, 48,79% são constituídos de floresta densa, 27,14% de floresta aberta, 17,17% de cerrado e 6,90% de campos naturais. A produtividade primária das pastagens no ecossistema de várzea tende a ser menor, à medida que a água vai se tornando

mais clara, em virtude da redução no tamanho das folhas e do vigor das gramíneas. A utilização das pastagens de solos de várzeas inundáveis está intimamente relacionada com o nível da água dos rios (PIEIDADE et al., 2005; LOURENÇO JUNIOR e GARCIA, 2008).

Nas regiões do Baixo e do Médio rio Amazonas, há uma diferença de nível de cinco metros entre a época mais seca (novembro e dezembro) e a mais cheia (maio e junho) em Santarém. Nestas regiões, o período das cheias coincide com a maior intensidade das chuvas e a época menos chuvosa com a vazante dos rios (SOUZA et al., 2011). Nesta época, os campos nativos de várzea apresentam excelentes condições para a exploração pecuária, onde é evidenciada a abundância de forrageiras de bom valor nutritivo. Na época das cheias, as pastagens ficam inundadas, dificultando o pastejo (VALE et al., 2013).

A pecuária é uma atividade muito importante para o desenvolvimento sócio-econômico das microrregiões do Baixo e Médio Amazonas. Nesses ecossistemas, as pastagens são melhor utilizadas na época seca. Sob o ponto de vista da alimentação animal, o ecossistema de várzea é formado, principalmente, por gramíneas dos gêneros *Echinochloa*, *Hymenachne*, *Leersia*, *Luziola*, *Paspalum*, *Oryza*, *Panicum*, *Eriochloa*, *Parathreria*, de elevada disponibilidade e destacado valor nutritivo, na época menos chuvosa (PIEIDADE et al., 2005; VALE et al., 2013).

A pecuária vem sendo desenvolvida em quatro distintos ecossistemas de pastagens, a saber: nativas de áreas inundáveis do estuário - Arquipélago de Marajó; nativas de áreas inundáveis mesorregião do Baixo Amazonas; nativas de terra firme; e cultivadas de terra firme, em áreas originalmente de floresta, onde a pecuária desenvolve-se principalmente (SOUZA et al., 2011).

Na mesorregião do Baixo Amazonas, as pastagens nativas de solos aluviais de várzeas têm representado papel fundamental no desenvolvimento da criação de bovinos e búfalos, por possuírem elevado potencial de produção e de bom valor nutritivo. Entretanto, essas pastagens apenas podem ser utilizadas na época seca, considerando que no período das cheias os produtores retiram os animais da várzea ou os mantêm em currais suspensos, denominados "marombas", alimentando-os com forrageiras nativas cortadas, inclusive com auxílio de embarcações, que transportam "ilhas" de vegetação. Entretanto, essa atividade é paliativa e realizada, principalmente, quando o rebanho é pequeno. Outro sistema usado consiste na retirada do gado da várzea para a terra firme, colocando-o em áreas de pastagens nativas de savanas bem drenadas, os denominados "campos de cobertos", onde as forrageiras possuem

reduzida disponibilidade e baixo valor nutritivo (RIBEIRO, 2002; LOURENÇO JUNIOR e GARCIA 2006; 2008; VALE e RIBEIRO, 2009) .

Ainda não estão suficientemente adotadas as tecnologias geradas sobre as relações entre as diferentes variáveis de ambiente, tais como clima, alimentação, práticas de manejo e instalações rurais, e os estados patológicos e fisiológicos dos rebanhos (SHEIKH et al., 2006; VALE et al., 2013; NEVES et al., 2014).

Mesmo com todas as críticas, como ferramenta de ocupação da Amazônia, a atividade pecuária foi eficaz e hoje, cerca de 20 milhões de brasileiros habitam a região, que já não é um imenso vazio. As críticas ao modelo, merecidas, parcialmente, pelos erros cometidos no passado, principalmente, em função do desconhecimento da região e pela falta de planejamento na implantação dos projetos, foram exageradas ao pretender afirmar que a região não tem vocação para a pecuária. Apesar de todas as restrições legais e de crédito, a partir de 1995, com a nova realidade econômica mundial e do Plano Real, a pecuária da Amazônia continuou a crescer em taxas somente possíveis para ecossistemas com elevada vocação pecuária, enquanto nas demais regiões do país o rebanho diminuiu ou não ultrapassa crescimento de 3% ao ano. Evidentemente, os produtores não estariam investindo recursos próprios em uma atividade antieconômica, uma vez que os subsídios, atualmente, praticamente inexistem. Atualmente, o contexto força os produtores a buscar maior eficiência para se manterem competitivos no mercado. Esse processo, aliado à lógica do mercado e à busca pelo menor preço, tem determinado a intensificação das propriedades, a verticalização da produção e a maior eficiência por área (LOURENÇO JUNIOR e GARCIA, 2006; NEVES et al., 2014).

A rentabilidade da pecuária depende da eficácia da exploração, do manejo racional das pastagens, do melhoramento genético do rebanho, da produção intensiva de carne e/ou leite, da produtividade alta, com economicidade e comercialização. Pequenos agricultores adotam a bubalinocultura como poupança, pois se trata de uma moeda forte e facilmente resgatável. O rendimento lucrativo dessa atividade torna-se mais palpável à medida que o setor produtivo adota novas tecnologias (LOURENÇO JUNIOR e GARCIA, 2006; NEVES et al., 2014).

Nos últimos anos tornou-se importante o estudo sobre a influência do meio ambiente sobre a produção animal (SHEIKH et al., 2006; VALE, 2007; SHARMA et al., 2014; BHAKAT, 2015). Os búfalos são animais homeotérmicos e, como tal, são capazes de manter a sua temperatura corpórea dentro de uma ampla faixa, valendo-se para isso de alguns artifícios fisiológicos e comportamentais que auxiliam na termorregulação (RIBEIRO, 2002).

Como os búfalos são criados em diferentes ambientes climáticos, fazem com que essa espécie se adapte aos mais diferentes ecossistemas. A temperatura ambiental é um dos fatores climáticos com maior influência sobre o ambiente físico em que o animal se encontra (RIBEIRO et al. 1994; TITTO et al., 1997; RIBEIRO, 2002; VALE e RIBEIRO, 2009; GARCIA, 2013).

3.2 ESTRESSE TÉRMICO E A SUA INFLUÊNCIA SOBRE O BÚFALO

O estresse pode ser definido como qualquer fator ou alteração proveniente do meio ambiente que interfira na homeostase, a qual é um sistema complexo e dinâmico de equilíbrio que rege o correto funcionamento dos organismos vivos. O estresse impede os animais de expressarem todo seu potencial genético, gerando redução no desempenho e prejuízos à eficiência reprodutiva (BHAKAT, 2015; PHOGAT et al., 2016). Ademais, entre os fatores que causam desequilíbrio da homeostase, os mais importantes são enfermidades, privações nutricionais, incorreto manejo do rebanho, transporte e estresse térmico, seja pelo frio ou pelo calor (JÖCHLE e LAMOND, 1980; SQUIRES, 2010; GARCIA, 2013).

Apesar da aparente adaptabilidade dos búfalos a climas adversos, como ocorre na Amazônia, apresentam características morfológicas específicas, como forte concentração de melanina na pele e no pelo, baixa quantidade e eficiência de glândulas sudoríparas, baixa densidade de pelos, sendo sensíveis à radiação solar, com dificuldade para dissipar calor (GARCIA, 2006; BARBOSA et al., 2007).

Na Amazônia, os valores médios de temperatura oscilam entre 24 °C e 28 °C, com máximas entre 29°C e 34°C e mínimas entre 16°C e 24°C. Nesses tipos climáticos, o período chuvoso ocorre entre dezembro e maio ou junho, e o menos chuvoso, nos demais meses do ano, com precipitação pluviométrica entre 1.500 e 3.500 mm/ano, com *superavit* hídrico, de janeiro a junho, e *deficit*, de agosto a dezembro. A umidade relativa do ar oscila entre 70% a 90% e a luminosidade de 1.500 a 3.000 horas/ano de brilho solar (LOURENÇO JUNIOR e GARCIA 2008; SOUZA et al., 2011).

Como o comportamento sexual depende da produção de hormônios, em especial dos produzidos pelo eixo-hipófise-gônadas e supra-renal, a secreção hormonal dessas glândulas endócrinas pode ser suprimida quando um agente estressor atua. Assim sendo, os machos submetidos a estresse térmico têm sua atividade sexual deprimida, com menor produção de

testosterona, devido a produção de substâncias estressoras secretadas pelo metabolismo (JÖCHLE e LAMOND, 1980; VALE, 1994; SQUIRES, 2003; GARCIA, 2006; KOONJAENAK, 2007; VALE, 2007; SQUIRES, 2010; PHOGAT et al., 2016).

O estresse interfere negativamente na fisiologia animal, como no sistema imune, que reduz as defesas do organismo e induz à degradação nutricional e menores taxas de crescimento e produção. Já que também, interfere na função digestiva, reduzindo a captação de nutrientes pelo organismo, refletidos pela falta de apetite e um comportamento mais apático (SQUIRES, 2010). Efeitos do estresse observados na Figura 2, adaptado de Squires (2010).

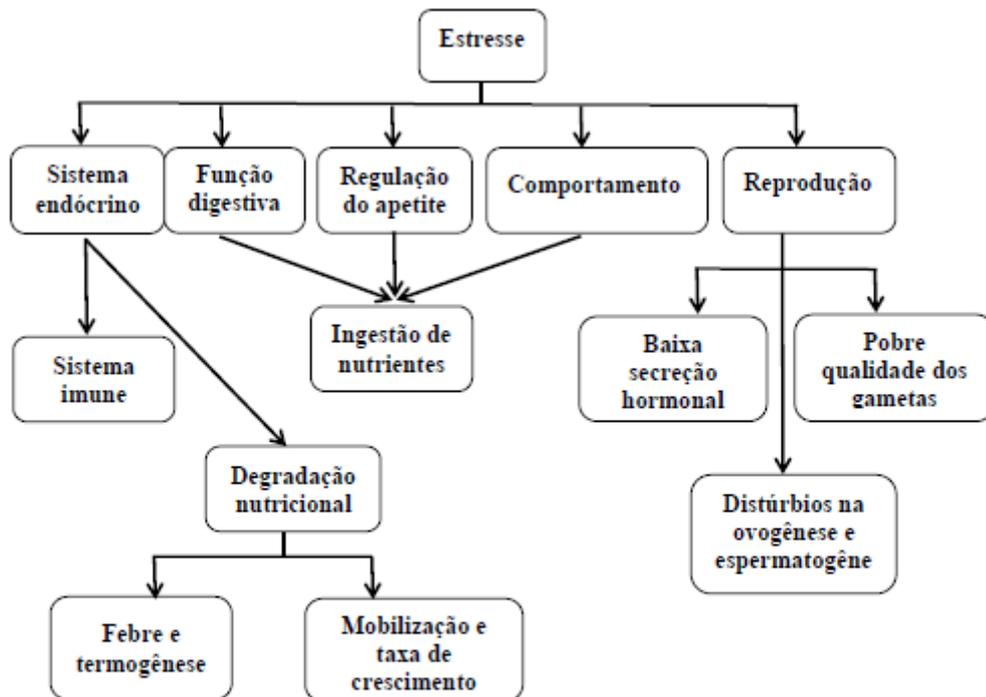


Figura 2. Efeitos do estresse sobre a ingestão de alimentos e a reprodução. Adaptado de Squires, 2010

Considera-se que as condições climáticas ideais para o desenvolvimento e a reprodução dos búfalos são temperatura ambiental entre 13 e 18°C, associada à umidade relativa ar média entre 55 e 65%, insolação de média intensidade e velocidade do vento entre 5 e 8 km/h (MARAI e HAEEB, 2010). Assim, com base nas características climáticas dos países onde a grande maioria dos contingentes bubalinos são criados, pode-se presumir que o real problema da bubalinocultura esteja relacionado pelo calor provocado pelo estresse térmico (GARCIA, 2013).

Nos machos, o estresse térmico se traduz em redução da qualidade seminal e menor viabilidade dos espermatozoides (SANSONE et al., 2000; VALE et al., 2007; BHAKAT, 2015). Por isso, em boa parte do território brasileiro, em especial no clima tropical úmido da Amazônia, práticas de manejo ambiental associadas ao manejo animal são fundamentais para a sustentabilidade do sistema de produção bubalino (GARCIA, 2006).

Tendo em vista que a espécie bubalina apresenta estacionalidade reprodutiva, a variação na qualidade seminal pode ocorrer em função da estação do ano, fotoperíodo, com maior atividade reprodutiva nas estações de outono/inverno, que apresentam os dias curtos (hora x luz) (SANSONE et al., 2000; PHOGAT et al., 2016). Essa variação ocorre inclusive em relação à testosterona, a qual surpreendentemente, na literatura consultada, apresenta menor concentração sanguínea no outono e no inverno, que são as estações da reprodução dos búfalos, do que na primavera e no verão. Portanto, nas regiões onde há estações bem definidas durante o ano, deve ser considerado se não há a influência da estação sobre a qualidade seminal (OHASHI, 2011). Nas condições do trópico úmido amazônico, o clima é caracterizado por períodos chuvosos e não-chuvosos, e em diversos locais a temperatura e umidade relativa se mantêm muito elevadas durante todo o ano, o que ocasiona desconforto e estresse térmico nos animais de fazenda, em especial nos búfalos.

3.3 INFLUÊNCIA DO CLIMA NA MORFOMETRIA, RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS EM BÚFALOS

O clima amazônico, que é caracterizado por apresentar altas temperaturas e umidade relativa do ar, pode promover respostas fisiológicas e comportamentais nos búfalos, a fim de manter a homeotermia. Alteração na frequência respiratória é o primeiro indicador de desconforto térmico, favorecendo assim, o equilíbrio térmico (SILVA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2015).

Outros mecanismos fisiológicos favorecem a termorregulação, como a elevação da temperatura da pele, para que haja evaporação cutânea do calor que é conduzido do núcleo central do corpo para a vascularização periférica. Se esses mecanismos adaptativos não funcionarem, ocorrerá elevação da temperatura retal, indicando que os mecanismos de liberação de calor tornaram-se insuficientes para manter a homeotermia (MATOS, 2008).

As observações comportamentais dos animais, quanto aos tempos de pastejo, ruminação ou ócio, e sua relação com as variáveis climáticas, permitem que criadores aperfeiçoem o manejo, reduzindo os graus de estresse e melhorando a produtividade (ABLAS et al., 2007). Pois animais com desconforto térmico, procuram diminuir suas atividades, o que reflete em menos tempo de pastejo ou até mesmo se reproduzindo (VALE, 2002; GARCIA, 2006; 2013) Fatores como pânico, raiva, ansiedade, ou mesmo doenças, podem prejudicar a ruminação e a sua eficiência, podendo ocorrer com o animal em pé ou deitado, sendo que esta última posição demonstra uma condição de conforto e bem-estar animal (ALMEIDA et al., 2015).

Em temperaturas elevadas, os animais deixarão de ingerir alimentos e passarão a ficar em ócio. Esse comportamento é estratégico, uma vez que a alimentação pode incrementar a termogênese, através dos processos de digestão e metabolismo dos alimentos. Além disso, buscam sombra e água para imersão nos momentos mais quentes do dia, principalmente, quando o índice de temperatura e umidade atinge o valor de 85%, o que é comum em regiões tropicais, e a partir de quando, o desconforto dos búfalos é maior (ABLAS et al., 2007). Estratégias de manejo podem aliviar a influência climática sobre os animais. Silva et al. (2011) indicam o uso de sombra de essências florestais para melhorar o conforto térmico, evidenciado pela estabilização das variáveis fisiológicas.

O conhecimento dos parâmetros morfológicos normais dos órgãos de uma espécie é um dos passos fundamentais para uma avaliação clínica segura de sua normalidade. Morfológicamente, o trato genital dos búfalos assemelha-se aos dos bovinos, sendo que, proporcionalmente, todas as estruturas que constituem o referido trato (bainha prepucial, bolsa escrotal, testículos, pênis e glândulas sexuais acessórias) apresentam-se menores que nos bovinos (BATTACHARIA, 1974; OHASHI et al., 1988, OHASHI, 2011). A bainha prepucial é aderida ao abdômen, semelhante a dos bovinos taurinos e bem menor que a dos zebuínos, apresentando, entretanto, poucos ou mesmo a ausência de pelos ao redor do óstio prepucial. Já a bolsa escrotal, localizada na região inguinal, apresenta poucos pelos e é menos pendulosa que nos bovinos, devido ao fato da constrição do colo da bolsa escrotal ser pouco pronunciada (OHASHI, 2011).

O padrão de desenvolvimento corporal e testicular dos bubalinos assemelha-se aos descritos para animais zebuínos (BRITO et al., 2002; DERAGON e LEDIC, 1990; VALE FILHO, 1988; VALE FILHO et al., 1989; GUIMARÃES, 1989; DODE et al., 1989), ou seja, apresenta o desenvolvimento mais lento, quando comparado ao padrão de desenvolvimento

testicular de animais taurinos, os quais aos 12-14 meses apresentam peso corporal de 400 kg e CE de 30-33 cm (COULTER, 1991; CHENOWETH, 1981; CARTER et al., 1980; COULTER et al., 1975; VALE et al., 2001; VALE et al., 2004).

As vesículas seminais, por sua vez, são menores que as dos bovinos, com cerca da metade de seu tamanho e com as lobulações também menores, com comprimento e largura média de $5,3 \pm 2,2 \times 1,9 \pm 0,9$ e $4,9 \pm 2,4 \times 1,8 \pm 0,8$ cm para os lados direito e esquerdo, respectivamente, sendo que as ampolas dos condutos deferentes apresentam comprimento médio de $9,3 \pm 3,7$ e $9,3 \pm 3,9$ cm para os lados direito e esquerdo, respectivamente (VALE et al., 1981).

Na avaliação andrológica de um reprodutor, é fundamental o conhecimento dos parâmetros biométricos normais dos testículos, especialmente a circunferência escrotal, que é uma das medidas biométricas mais utilizadas na avaliação, tanto do desenvolvimento reprodutivo quanto do testicular, por ser de fácil obtenção e alta repetibilidade, além de apresentar alta correlação com o peso corporal, com a capacidade reprodutiva do animal (MELO, 1991; OHASHI, 1993; CHACUR, 1999, 2001; VALE et al., 2001; VALE et al., 2004), bem como com a produção espermática (PANT et al., 2003; BRITO et al., 2004; AHMAD et al., 2010).

Em bubalinos, dados sobre a biometria testicular são poucos e com grande variação entre eles, tendo em vista a diferença racial e de manejo nutricional, dificultando, assim, a obtenção de uma padronização do tamanho testicular para a referida espécie. Entretanto, trabalhos atuais apresentam uniformidade de seus dados, em que a média da circunferência escrotal (CE) de animais adultos (>36 meses de idade), mantidos em condições semelhantes de manejo em pastagens de boa qualidade, foi de $32,1 \pm 1,5$ cm para a raça Murrah (PANT et al., 2003; VALE et al., 2001; VALE et al., 2004) e de $32,7 \pm 2,7$ cm (OHASHI, 1993), $32,4$ cm (CRUDELLI et al., 2001) e $32,4 \pm 2,1$ cm para animais mestiços (QUIRINO, 2002).

Deve ser ressaltado, entretanto, que fatores relacionados ao manejo nutricional influenciam tanto o desenvolvimento corporal quanto o testicular, o que indica que estudos dessa natureza precisam ser realizados com bubalinos, por meio dos quais poderão ser avaliados com confiabilidade o potencial produtivo e o reprodutivo da referida espécie (OHASHI, 2011).

No entanto, é importante ressaltar que a CE não deve ser usada como o único parâmetro para a seleção de reprodutores, pois há a necessidade do exame clínico-andrológico

completo, incluindo a análise do sêmen e espermiograma para que seja certificada a capacidade reprodutiva do touro (VALE, 1994; CBRA, 2013).

Ohashi (1993) desenvolveu um trabalho voltado para o estudo de parâmetros biométricos testiculares (CE, comprimento e largura testicular), endocrinológicos e de atividade espermatogênica em machos bubalinos mestiços (Mediterrâneo x Murrah) de diferentes faixas etárias. O autor observou que os animais apresentaram desenvolvimento da CE constante e gradual, com correlação positiva ($p < 0,05$) com o peso corporal ($r^2 = 0,95$) e crescimento linear em relação ao peso corporal. Aplicando as respectivas equações, observou-se que a estabilização do crescimento da CE teve início nos animais ao atingirem o peso corporal de 650-750 kg e 36-48 meses de idade, indicativo de que esses animais atingiram a fase adulta, tendo em vista a estabilização no desenvolvimento corporal e testicular.

Alta correlação entre a idade e peso corporal com a CE já foi descrita em búfalos de rio ($2n = 50$) por Yassen e Mahmoud (1979), Ahmad et al. (1984), Melo (1991), Vale et al. (2001), Vale et al. (2004) e em búfalos de pântano ($2n=48$) por Bongso et al. (1984) e McCool et al. (1985).

3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO EJACULADO BUBALINO

A análise do sêmen é uma das principais etapas no processo de avaliação da saúde reprodutiva de um animal, entretanto problemas técnicos durante a colheita podem induzir a erros no diagnóstico. Em búfalos, o método indicado para a colheita de sêmen é o da vagina artificial, cujo modelo é o mesmo utilizado para bovinos, sendo que um pouco mais curta, com cerca de 30-35 cm de comprimento (VALE, 1994; VALE, 2002; OHASHI, 2011). Além disso, não há a necessidade de lubrificar a vagina artificial, pois a lubrificação natural do pênis é suficiente, porém a temperatura interna da vagina deve estar ao redor de 42-44°C (OHASHI, 2011).

Em búfalos, deve-se evitar colocar dois touros adultos (acima de cinco anos) no mesmo recinto da colheita, sem um condicionamento prévio, pois não é raro ocorrer briga entre eles, visto que o touro búfalo tem o comportamento marcante de demarcação do seu

território. Por este mesmo motivo, também não é aconselhado o uso de manequim macho para a colheita de sêmen (VALE, 2002; OHASHI, 2011).

Para condicionar os animais à colheita por vagina artificial, é aconselhado o uso, como manequim, de uma fêmea em cio, o qual pode ser induzido por hormônio. Após o condicionamento dos animais, não há mais a necessidade da fêmea estar no cio para a realização da colheita do sêmen (VALE, 2002; OHASHI, 2011).

O volume do sêmen de búfalos varia de 2 a 3 ml para animais jovens, na faixa etária de dois a três anos de idade e de 4 a 6 ml para animais acima de quatro anos, com concentração variando de 0,8 a $1,5 \times 10^9$ espermatozóides/mL e motilidade de 70-80% (VALE, 1994, 2002; JAVED et al., 2000; PANT et al., 2003; OHASHI e BARUSELLI, 2008). Quanto a concentração do ejaculado bubalino normal é esperada uma variação de $0,6 \times 10^6$ a $1,2 \times 10^6$ /mm³ (VALE, 2011).

O ejaculado normal do búfalo tem coloração branco-leitoso a acinzentado, raramente ultrapassa 5 mL e possui concentração espermática entre 300 e 1.500 milhões de células por mL (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004). Segundo Vale (2002), um ejaculado bubalino de boa qualidade apresenta volume que varia de 1,0 a mais de 3,0 mL, concentração espermática de 600 a 1.200 milhões de espermatozóides por mL, turbilhonamento mínimo de 3 (escala de 0 a 5), motilidade espermática entre 60 e 80%, vigor de pelo menos 3 (escala de 0 a 5) e pH entre 6,5 e 7,2. Já Barnabe (1999) cita que os padrões mínimos para a classificação de uma amostra “provavelmente fértil” de sêmen de búfalo são: 500 milhões de espermatozóides por mL, mais de 60% de espermatozóides móveis com progressão retilínea e mais de 70% de espermatozóides com morfologia normal.

Segundo Vale (1994) e CBRA (2013) para o sêmen bubalino, as características de normalidade, após colheita por vagina artificial, com volume mínimo de 3 mL, vigor mínimo de 3, motilidade superior a 70%, integridade de membrana plasmática acima de 70% e defeitos totais não superiores a 30%.

Em búfalos adultos, existe uma variação da qualidade seminal em função da época do ano, o que pode ser atribuído, principalmente, a um efeito das temperaturas do ambiente sobre o animal e, conseqüentemente, sobre a espermatogênese. Segundo Gangwar (1980), durante os meses de verão, a porcentagem de espermatozóides vivos em ejaculados de búfalos adultos é de $64,6 \pm 4,4\%$, deliberadamente inferior aos dados alcançados no outono, inverno e primavera, quando se obtêm valores de $90,5 \pm 0,8\%$, $84,5 \pm 2,3\%$ e $95,7 \pm 1,5\%$,

respectivamente. A composição química do sêmen bubalino também sofre variações ao longo do ano.

A avaliação clínica e reprodutiva de machos pode ser complementada pela análise de componentes metabólicos destes animais no sêmen. Em reprodução, alguns metabólitos são mais específicos. Mesmo sendo um exame auxiliar, a avaliação bioquímica do sêmen permite uma avaliação tanto de indivíduos como de rebanhos, indicando desequilíbrios metabólicos, nutricionais, patologias, alterações clínicas ou subclínicas (VALE et al., 2002).

Os carboidratos presentes em secreções acessórias masculinas e plasma seminal são parcialmente livres e parcialmente ligados a proteínas. Carboidratos livres é predominantemente na forma de frutose, mas uma pequena quantidade de glicose e outros monossacarídeos também são encontrados em sêmen de mamíferos. Os polióis principais são inositol e sorbitol. No início das pesquisas sobre o sêmen de mamíferos especulou-se que o plasma seminal continha um açúcar redutor, às vezes em concentrações que excediam o nível de glicose no sangue. Este açúcar redutor assumido inicialmente como a glicose, foi identificado como sendo a frutose (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

Na maioria dos mamíferos onde a frutose é o principal componente do plasma seminal estão o homem, primatas, touro, suíno, búfalo, carneiro, veado, elefante, toupeira, ouriço, coelho, esquilo, cão de pradaria, hamster, roedores, cobaia e marsupiais. Existem diferenças quantitativas acentuadas dentro das espécies e entre os indivíduos da mesma espécie, por exemplo na espécie humana, os níveis de homens normais cerca de 200-300 mg / 100 mL são mais frequentemente encontrados, enquanto os valores entre 50 e 500 mg / 100 mL não são incomuns. No touro e no bode, a concentração de frutose no sêmen chega às vezes a 1 g / 100 mL, mas os valores em torno de 500 mg / 100 mL são mais comuns. No suíno, a frutose seminal raramente excede 50 mg / 100 mL, mas a ejaculação do varrão é aproximadamente 100 vezes mais volumosa do que a bovina. A bioquímica da formação de frutose, proveniente das vesículas seminais na maioria dos mamíferos, apresenta três possíveis vias de formação, todas advindo a partir da glicose sanguínea a saber: i. conversão da glicose no sangue para glicogênio tecidual, onde o epitélio secretor glandular armazena ou metaboliza por meio de reações intermediárias, envolvendo sequencialmente fosforilação de glicogênio a glicose 1-fosfato, com a conversão deste último em glicose 6-fosfato, através da enzima fosfoglucomutase, transformação da glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato pela enzima fosfohexoseisomerase e desfosforilação de frutose-6-fosfato a frutose e fosfato inorgânico; ii.

fosforilação direta da glicose no sangue a glicose 6-fosfato pela hexoquinase e ATP, seguida pela formação de frutose 6-fosfato em primeiro lugar, e depois frutose livre; e iii. uma via não fosforilativa compreendendo sucessivamente a redução da glicose em sorbitol com a participação da enzima aldose redutase na presença de NADPH e oxidação de sorbitol em frutose pela enzima cetose redutase (sorbitol desidrogenase) na presença de NAD (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

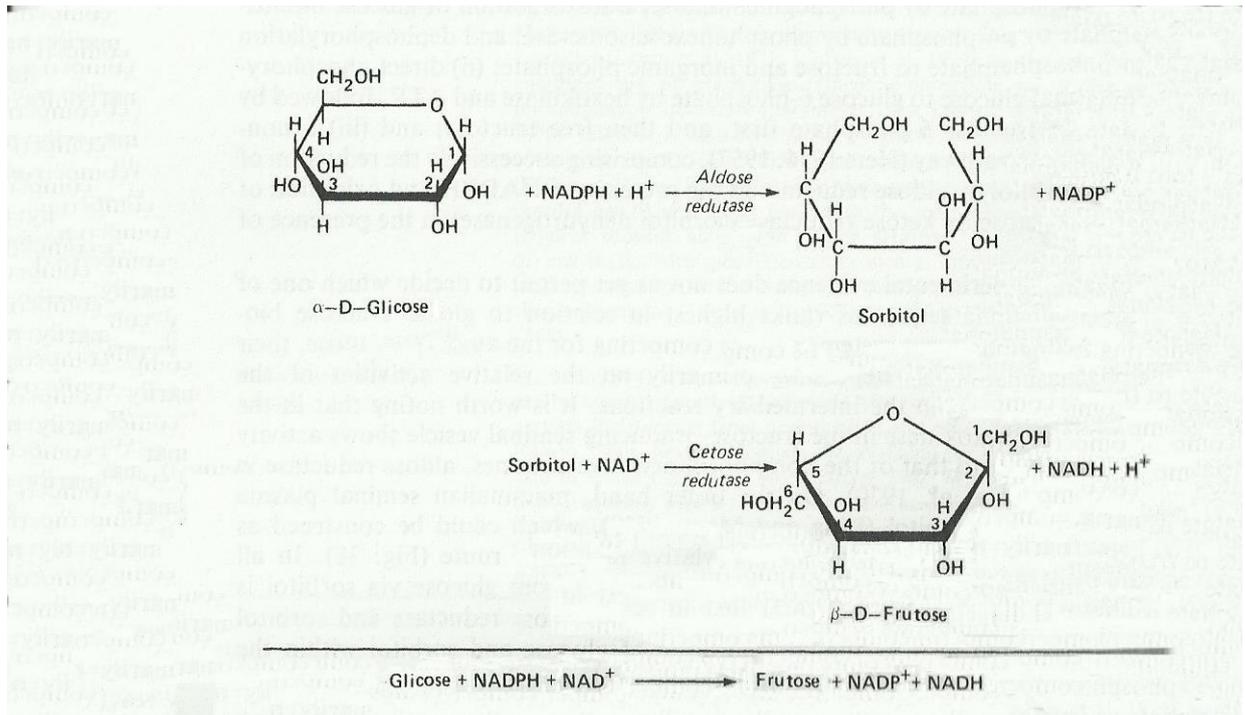


Figura 3- Mecanismo não-fosforilativo da formação da frutose. Adaptado de Mann e Lutwak-Mann (1981).

Os elementos minerais têm uma grande importância e diversidade de usos dentro do organismo animal. Os seguintes elementos minerais são reconhecidos como essenciais para as funções corporais em todos os mamíferos: cálcio, fósforo, sódio, molibdênio, cloro, magnésio, ferro, selênio, iodo, manganês, cobre, cobalto, zinco, flúor e cromo. A proeminência de cada elemento mineral nos tecidos do corpo está intimamente relacionada com o seu papel funcional. Como constituintes dos ossos e dentes, os minerais proporcionam força e rigidez às estruturas esqueléticas. Em seus estados iônicos nos fluidos corporais são indispensáveis para a manutenção do equilíbrio ácido-base e relação osmótica com o ambiente aquático e para atividades de integração envolvendo os sistemas nervoso e endócrino. Como componentes de pigmentos de sangue, enzimas e compostos orgânicos em

tecidos e órgãos são indispensáveis para processos metabólicos essenciais envolvendo trocas gasosas e transações de energia (BACILA, 2003). Na reprodução os minerais são importantes para a fertilidade, tanto na fêmea, como no macho (PRINCEWILL et al., 2015).

A composição bioquímica do plasma seminal (PS) é muito complexa e variável entre as espécies. Os avanços nas tecnologias reprodutivas revelam que o PS é importante como um meio nutritivo-protetor para as células espermáticas suspensas nele; e alguns componentes do PS são muito importantes para o metabolismo dos espermatozoides, bem como a função das células espermáticas, sobrevivência e transporte no trato reprodutivo feminino. A bioquímica do PS é um campo de pesquisa relativamente moderno, e em rápida expansão, particularmente no que se refere ao significado biológico dos vários constituintes bioquímicos. No entanto, a identificação de fatores ativos no PS e os mecanismos pelos quais eles agem, não são suficientemente compreendidos em diferentes espécies. No búfalo, ainda são poucas as pesquisas realizadas sobre as concentrações de minerais no PS (PRINCEWILL et al., 2015).

O cálcio (Ca) é necessário em muitos processos fisiológicos como um regulador em todas as células vivas, incluindo espermatozoides. Os espermatozoides são células altamente diferenciadas, sendo a membrana plasmática o principal componente celular envolvido no funcionamento diverso e complexo da célula espermática para conseguir a fertilização. Muitos destes processos funcionais tornam-se eficazes pelo transporte de íons através da membrana plasmática, através de canais iônicos, sendo os mais variados tipos de canais de cálcio, os mais estudados no comportamento dos espermatozoides (PUBLICOVER et al., 2007; YEUNG e COOPER, 2008). De acordo com Eghbali et al., (2010) o Ca presente no plasma seminal de touros búfalos desempenha um papel importante na preservação da motilidade e viabilidade dos espermatozoides, bem como no estado antioxidante, protegendo os danos oxidativos dos espermatozoides. Por outro lado, a correlação negativa entre o conteúdo de Ca no plasma seminal e a motilidade dos espermatozoides foi encontrada no sêmen bovino (Machal et al., 2002). Os resultados de Asadpour (2012) mostraram que níveis elevados de Ca estavam associados com menor porcentagem de espermatozoides móveis em carneiros.

A ingestão inadequada de fósforo (P) tem sido associada à diminuição da taxa de fertilidade, consumo de ração, produção de leite, diminuição da atividade ovariana, atraso na maturidade sexual e baixa taxa de concepção (CROMWELL, 1997). O P é também necessário para a manutenção da glicólise e motilidade. A concentração de P detectada no plasma

seminal de touros ativos por Machal et al. (2002) foi positivamente correlacionada com parâmetros de quantidade e qualidade de sêmen bovino.

Por outro lado, a presença de magnésio (Mg) é necessária para a capacitação, hiperativação e reação do acrosoma dos espermatozóides (SEMCZUK e KURPISZ, 2006). Estudos têm demonstrado que o nível de Mg no plasma seminal aumenta com a concentração de espermatozóides, mas não tem relação significativa com a motilidade espermática (WONG et al., 2001). Por outro lado, os efeitos positivos do Mg na motilidade, morfologia e concentração de espermatozóides foram relatados por Marzec-Wróblewska et al. (2012). Kaludin e Dimitrova (1986) encontraram uma correlação proporcional direta entre a concentração de Mg e a motilidade do espermatozóide de carneiro. Eghbali et al. (2010a), demonstraram que o teor de magnésio no plasma seminal foi positivamente associado com o *status* antioxidante total do sêmen.

Mohan et al. (1994) detectaram concentrações de 568,53 mg/ dL de frutose, 5,27 g/ dL de proteínas totais, 74,13 g/ dL de colesterol total, 13,59 g/ dL de fosfato inorgânico, 115,87 mg/ dL de sódio e 22,7 mg/ dL de potássio na composição química do sêmen de búfalos adultos criados na Índia, e, portanto, mantidos em ambiente tropical. A congelabilidade média do sêmen desses búfalos, representada pela porcentagem de espermatozóides vivos após a descongelação, foi de $38,39 \pm 1,42\%$, e apresentou correlação positiva com o valor de proteínas totais no sêmen.

Na região sudeste do Brasil, segundo Oba et al. (1994), o perfil bioquímico do sêmen de bubalinos varia ao longo do todo o ano. No final do outono (maio), quando as temperaturas são mais amenas, o sêmen bubalino apresenta concentrações de frutose e ácido cítrico (526,51 mg/% e 549,22 mg/%, respectivamente) maiores que a média anual, sendo esses elementos importantes para o metabolismo espermático e para o processo de criopreservação.

A composição iônica do sêmen é de extrema importância para os processos de criopreservação do espermatozóide, visto que muitos processos enzimáticos são dependentes de íons como cofatores para sua atividade, como foi mencionado anteriormente em relação ao íon Ca^{2+} , às mudanças de volume celular dos espermatozóides que são muito grandes num curto espaço de tempo, durante os processos de congelação e descongelação e também as alterações de osmolaridade durante a formação de gelo (GARCIA, 2013).

Os processos de congelação e descongelação podem facilitar a entrada de sais extracelulares como já mencionado por Karagiannidis (1976), que demonstrou a inversão dos valores de concentração de cálcio intra e extracelulares do espermatozóide frente ao choque

do resfriamento. Isso pode afetar os sistemas mensageiros como a Adenilato Ciclase (AC), Guanilato Ciclase e Calmodulina que são as responsáveis pela conversão do ATP em AMPc. Tal como o cálcio, o magnésio e o manganês (potentes estimuladores da atividade da AC nas células espermáticas), a concentração de AMPc também pode estar relacionada com a motilidade e capacitação dos espermatozoides (TASH e MEANS, 1983).

Pangawkar et al. (1988), afirmaram que altos níveis de magnésio e cloretos no plasma seminal de touros podem alterar a ligação de proteínas à membrana dos espermatozoides afetando a resistência dos mesmos à congelação, e conseqüentemente, ao processo de descongelação. Aanesen et al. (1996), mencionaram a presença de GABA (Ácido Aminogamabutírico), bastante conhecido como um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central e de receptores-GABA no plasma seminal e células espermáticas humanas cuja função, nesta, ainda é desconhecida. Acredita-se porém, participar do metabolismo de capacitação espermática e reação acrossomal, uma vez que sua presença também foi observada no trato reprodutivo feminino e tais receptores sejam estimulados pela presença de esteróides. Cabe salientar que o mecanismo fisiológico dos receptores de GABA para uma de suas funções, a de transporte de proteínas entre membranas biológicas, é absolutamente dependente de cloretos, preferencialmente aqueles associados ao sódio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O município de Santarém (02° 26' 35" S; 54° 42' 30" W) pertence à mesorregião do Baixo Amazonas. Dista em linha reta de Belém, Estado do Pará, de 1.520km. Faz parte da cobertura vegetal do município a floresta equatorial latifoliada e os campos cerrados localizados nas áreas de terra firme. O principal rio do município é o Tapajós, que o atravessa no sentido Sul-Norte, em seu baixo curso desembocando na foz do rio Amazonas, pela margem direita, a sede municipal. A temperatura ambiental é sempre elevada, com média anual de 25,6 °C, e a umidade relativa do ar, esta apresenta valores acima de 80% no decorrer de quase todos os meses do ano. A pluviosidade se aproxima dos 2.000 mm anuais porém, caracterizada por certa irregularidade de chuvas entre os meses de julho a novembro, com a estação chuvosa coincidindo com os meses de dezembro a junho (SOUZA et al., 2011).

Para caracterizar a área de estudo, uma mini-estação meteorológica (WS-GP1 Weather Station, AT Delta-Devices Ltda, Cambridge, UK) foi instalada no local do experimento, para aferir temperatura ambiente (°C), porcentagem de umidade relativa do ar (%), pluviosidade (mm), radiação solar (W/m²) e velocidade do vento (m.s-1). As variáveis climáticas eram captadas a cada 30 minutos, e o total de amostras registradas foram 11.220. A mini-estação estava localizada perto de onde os touros estavam acomodados. Devido aos níveis máximos médios distintos de temperatura ambiente, chuva e umidade, para os fins do presente estudo, conforme literatura, dividimos o ano em duas estações: (i) a estação chuvosa: Dezembro-Junho; (ii) a estação não chuvosa: Julho-Novembro.

4.2 ANIMAIS E PERÍODO DO EXPERIMENTO

Foram utilizados como doadores de sêmen cinco touros bubalinos Murrah, selecionados de um lote de 12 touros adultos, pré-avaliados por exame clínico e andrológico, tendo como critério a melhor qualidade espermática apresentada na primeira colheita de sêmen. O experimento foi realizado na cidade de Santarém, Oeste do Pará, nos períodos chuvoso e não-chuvoso de 2016, no Laboratório de Biotecnologia Animal da UFOPA,

localizado no Parque de Exposições Agropecuárias do Sindicato Rural de Santarém. Os doadores ($2,5 \pm 0,5$ anos e $450,0 \pm 35,5$ Kg) foram mantidos confinados, separados em baias individuais, alimentados à base de forrageira *Echinochloa polystachya* (canarana-de-pico) e suplementados com dois kg de ração comercial, composta por milho, soja e sorgo (com 16% de proteína bruta). Os animais tiveram acesso constante à água fresca e limpa, além de sal mineral (marca Tortuga®, Fosbovi, São Paulo, Brasil) *ad libitum*. O controle sanitário (anti-helmíntico e suplementação vitamínica) foi realizado conforme critérios pré-estabelecidos para espécie, bem como vacinação contra Febre Aftosa e teste para brucelose e tuberculose.

O período experimental fora dividido em duas fases: período chuvoso (PCh), de fevereiro a maio e o período não-chuvoso (PnCh), de agosto a novembro de 2016. As colheitas de sêmen foram realizadas duas vezes por semana, entre 06h00 e 07h00. Os animais recebiam banhos diários, pela manhã e pela tarde. Os animais tiveram um mês de adaptação, antes do experimento iniciar.



Foto 1- Touro bubalino (*Bubalus bubalis*) doador de sêmen, pertencente ao rebanho experimental, proveniente da Messorregião do Baixo Amazonas (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).

4.3 ASPECTOS ÉTICOS DO EXPERIMENTO

O experimento não utilizou tratamentos diretamente sobre os animais e, sim, sobre material colhido dos indivíduos (sêmen). As colheitas de sêmen foram realizadas por

metodologia já consagrada e vastamente publicada na literatura internacional, de modo seguro e indolor. Antes de cada colheita, os animais eram escovados e lavados, para relaxarem. Como já eram animais dóceis, durante o experimento não ocorreram acidentes nas colheitas, nem com animais, nem com pessoas.

Como doadores de material biológico para pesquisa, os touros foram mantidos dentro dos princípios de boas práticas de produção animal (EMBRAPA, 2006), com direito pleno às cinco liberdades animais, quais sejam: 1) Liberdade fisiológica: animais livres de fome, sede e desnutrição; 2) Liberdade ambiental: animais livres de desconforto; 3) Liberdade sanitária: animais livres de dor, injúria e doença; 4) Liberdade comportamental: animais livres para expressar um comportamento normal; e 5) Liberdade psicológica: animais livres de medo e estresse negativo (PAIXÃO, 2005). O protocolo experimental do presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Oeste do Pará.

4.4 ANÁLISES SEMINAIS

O processamento seminal e as análises laboratoriais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal da Universidade Federal do Oeste do Pará. As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vagina artificial (modelo Minitub, Germany), segundo a metodologia preconizada para búfalos por Vale (1994), sendo colhidos 30 ejaculados por touro, dez ejaculados no período chuvoso e vinte no período não-chuvoso, totalizando cento e cinquenta amostras para análises. Previamente a cada colheita, os animais recebiam uma ducha no banho, e levados até a fêmea (manequim), contida em um tronco. Um mês antes das colheitas seminais iniciarem, os animais foram manejados para se condicionarem ao uso da vagina artificial. No período não-chuvoso, foram obtidas mais amostras (20) que no período chuvoso (10), pois os animais já estavam bem condicionados ao uso da vagina artificial, além disso, a menor quantidade de amostras nesse período não prejudicou as análises estatísticas.

As avaliações das amostras de sêmen foram realizadas com sêmen *in natura*, imediatamente após a colheita. As análises imediatas realizadas foram pertinentes às características físicas e morfológicas dos ejaculados (Foto 2), e corresponderam à aferição de volume, cor, aspecto, turbilhonamento, concentração do ejaculado, motilidade progressiva,

vigor, avaliação de integridade de membrana plasmática e morfologia espermática (VALE, 1994; CBRA, 2013).

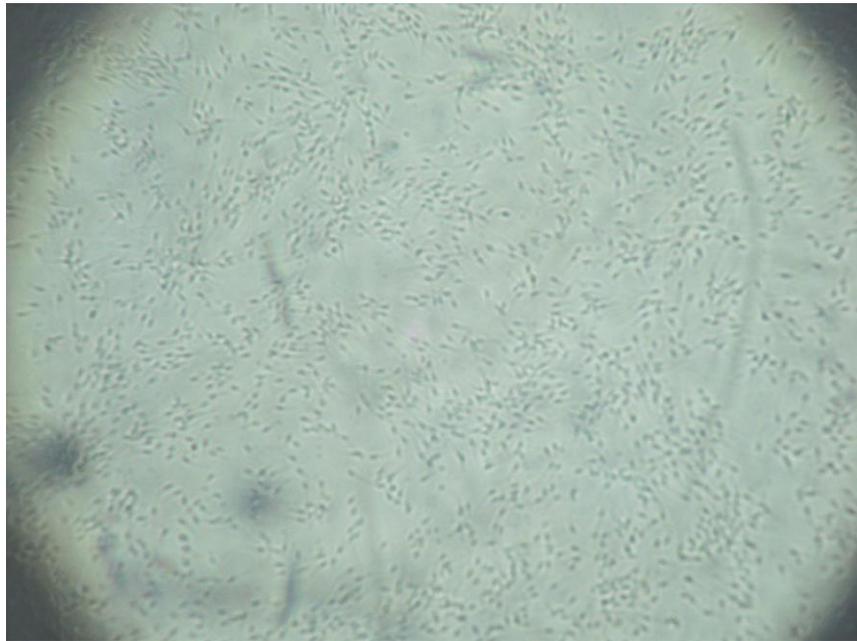


Foto 2- Imagem fotográfica de microscopia óptica durante avaliação de sêmen bubalino, em aumento de 100x (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).

O volume do sêmen obtido nas colheitas foi aferido em tubo volumétrico (em mL), enquanto a cor e o aspecto foram avaliados em escala visual (VALE, 2002). Enquanto o turbilhonamento, foi avaliado através da amostra de uma gota de 20 μ L de sêmen em uma lâmina pré-aquecida, observada com aumento total de 40x, recebendo pontuação em escala de 0 a 5 (0, ejaculado com ausência de ondas e 5, presença de muitas ondas espermáticas, movimentando-se rapidamente), conforme Vale, 1994; CBRA, 2013.

A concentração espermática foi feita por contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. O número total de espermatozoides foi dado em milhões de células por mL (VALE, 1994; CBRA, 2013).

A motilidade espermática foi avaliada por método de microscopia óptica, com aumento total de 40x. Cada amostra de 10 μ L de sêmen foi depositada sobre lâmina e lamínula pré-aquecida. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com motilidade progressiva. Enquanto que o vigor foi avaliado na mesma lâmina em que se avaliou a motilidade, sob o mesmo aumento. Sua avaliação foi dada em escala que variou de 0 a 5 (0: ausência ou fraca movimentação espermática até 5: forte movimentação), conforme Vale, 1994; CBRA, 2013.

Para avaliação da morfologia espermática, as amostras de sêmen foram fixadas em solução de formalina tamponada e avaliadas em preparação de gota úmida convencional, observada sob microscopia de contraste de fase (Foto 3 e 4), com aumento total de 1000x (Leitz, Germany). Para posterior comparação das técnicas, também amostras foram coradas com eosina-nigrosina de acordo com recomendações do CBRA (2013), e avaliadas em microscópio óptico comum, com aumento de 1000x. Foram contados e classificados 200 espermatozoides por amostra, sendo que os defeitos estruturais foram expressos em porcentagem de defeitos menores, defeitos maiores e defeitos totais (BLOM, 1973; VALE, 1994; CBRA, 2013).



Foto 3- Imagem fotográfica de microscópio de contraste de fase (Leitz, Germany). (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).

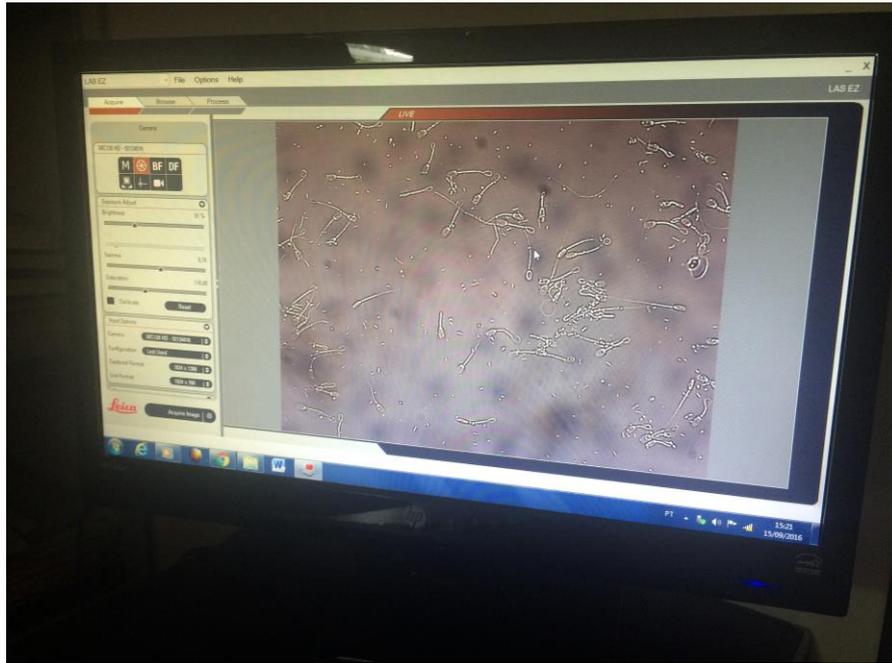


Foto 4- Imagem fotográfica de microscopia de contraste de fase (Leitz, Germany) com aumento total de 1000x, sendo projetada em computador acoplado ao equipamento. (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).

Blom (1973), associou a classificação da morfologia espermática ao grau de importância do defeito para a fertilidade. E classificou em defeitos maiores e defeitos menores (Tabela 1), sendo expressos em porcentagem. Na Foto 5, um exemplo de patologia identificada em microscópio de contraste de fase.

Tabela 1- Defeitos maiores e menores, segundo Blom (1973) quanto a morfologia espermática.

Defeitos Maiores	Defeitos Menores
Defeitos de acrossoma (Knobbed, grânulo persistente, destacado)	Cabeça delgada
Gota citoplasmática proximal	Cabeça curta, larga, gigante, pequena
Subdesenvolvido	Cabeça isolada normal
Cabeça isolada patológica	Inserção: abaxial, retroaxial e oblíqua
Cabeça estreita na base	Cauda dobrada ou enrolada
Cabeça piriforme	
Cabeça pequena anormal	
Contorno anormal	
Cabeça com vacúolos: diadema ou pouch formation	

Peça intermediária: saca-rolha, corkscrew, fibrilação, desnuda, fratura parcial ou total, edema, peça intermediária rudimentar ou stump, pseudo-gota e outros.

Formas teratológicas

Cauda fortemente dobrada/ enrolada

Cauda enrolada na cabeça

Cauda dobrada ou enrolada com gota

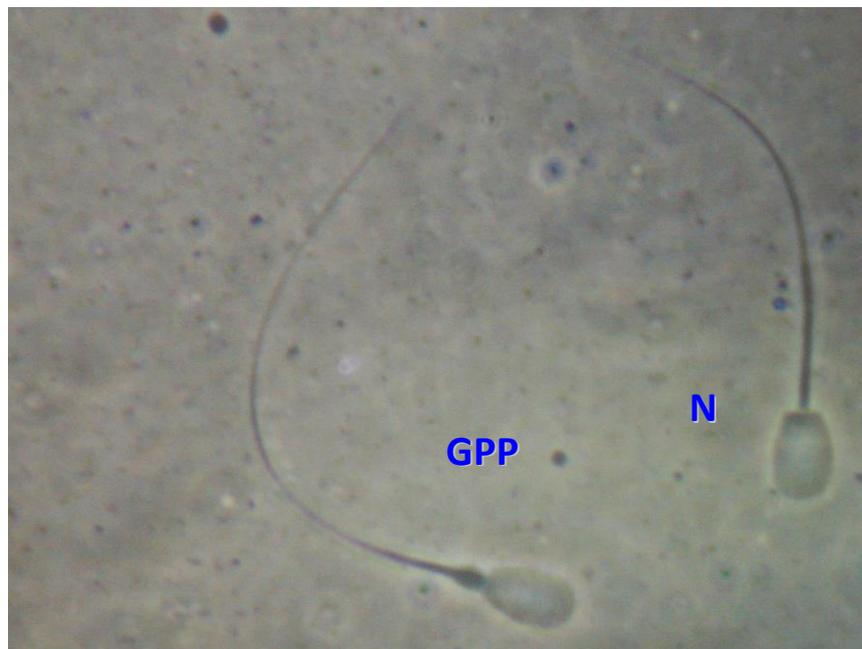


Foto 5- Imagem fotográfica de microscopia de contraste de fase de espermatozoides bubalinos, em aumento de 1000x. No detalhe, espermatozóide normal (N) e espermatozóide com gota protoplasmática proximal (GPP) (Fonte: Arquivo pessoal, 2016).

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada pelo teste hiposmótico (HOST), conforme Rasul et al. (2000) e Barros et al. (2007). A solução hiposmótica foi preparada com 0,735g de citrato de sódio e 1,351g de frutose para 100 mL de água destilada (pressão osmótica de 190 mOsm kg⁻¹). As amostras para avaliação foram preparadas pela adição de 50 µL de sêmen a 500 µL da solução hiposmótica. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, uma amostra de 10 µL foi examinada em microscópio de contraste de fase, sob aumento total de 1000x. Duzentos espermatozoides foram contados e classificados, de modo que alterações (curvaturas) na cauda dos espermatozoides após o teste indicaram que a célula apresentava membrana

plasmática normal, sendo esta, considerada íntegra do ponto de vista funcional. Já os espermatozoides que não apresentaram curvatura na cauda foram considerados como tendo membrana plasmática lesada.

Para a avaliação bioquímica do sêmen, o plasma seminal foi colhido por centrifugação a 2800 rpm, durante 10 min, e os sobrenadantes foram transferidos para tubos Eppendorf® de 2,0 ml e re-centrifugados para separar as células espermáticas restantes.

Para a determinação das concentrações de Frutose, cálcio (Ca), Fósforo (P), Magnésio (Mg), albumina e proteínas plasmáticas totais (PPT) foram utilizados kits comerciais da marca LABTEST®. Para todas as análises foram calculados os fatores de calibração, conforme protocolos dos kits.

A frutose foi estimada pelo método espectrofotométrico a 505nm (absorbância padrão). A amostra com o reagente foram homogeneizados vigorosamente e incubados a 37°C durante 10 minutos. O nível da água do banho-maria foi superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

O cálcio também foi estimado pelo mesmo método, com 570nm de absorbância padrão. Para tal análise, misturou-se três volumes do primeiro reagente com um volume do segundo reagente do kit. Essa mistura fica estável por até oito horas, entre 15 a 25°C. O reagente foi colocado diretamente na cubeta, zerando o aparelho; após, acrescentou-se a amostra, homogeneizou-a na cubeta e fez-se a leitura.

Para análise do fósforo, foi utilizada absorbância de 650nm no espectrofotômetro. O procedimento foi realizado em etapas: inicialmente misturou-se água destilada com a amostra, e uma gota do catalisador; após mistura uma gota do reagente molibdato, agitando fortemente no vórtex, ocorrendo turvação; colocou-se em banho-maria de água fria (20-25°C) durante três minutos. O nível da água do banho foi superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Após, duas gotas da solução tampão, agitou-se fortemente no vórtex e voltou para banho frio por cinco minutos. Foi realizada a leitura imediatamente, pois a cor fica estável por quinze minutos.

O magnésio foi analisado com absorbância padrão de 505 nm pelo método espectrofotométrico. A amostra era misturada ao reagente, esperando dois minutos para analisar. A cor fica estável por trinta minutos.

Para a albumina a absorbância padrão foi de 630 nm. O reagente era misturado com a amostra, e após dois minutos, e no máximo dez minutos, realizada a leitura.

A proteína total foi estimada pelo método espectrofotométrico a 545 nm (Absorvência da proteína a 545 nm). A amostra era misturada ao reagente biureto, incubada a 37°C em banho-maria, por dez minutos, de acordo com o protocolo do kit. A cor fica estável por até uma hora.

4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS

Durante o período experimental, os animais foram examinados uma vez por semana para realizar mensurações de circunferência escrotal, perímetro torácico e peso.

Foram aferidos, antes de cada colheita seminal, parâmetros de frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e temperatura de superfície. Para aferições da frequência cardíaca e frequência respiratória, fora utilizado estetoscópio; para temperatura retal, o termômetro digital e para a temperatura corpórea de superfície, uso de termômetro digital infravermelho com mira laser (-50° a 380° C, Benetech, modelo: GM300) nas regiões de cabeça, dorso (quadril), virilha e testículos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados meteorológicos foram avaliados usando o modelo linear geral (GLM), enquanto que os dados de sêmen foram examinados usando a instrução de medida repetida do procedimento MIXED (Proc MIXED) do software Statistical Analysis Systems (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O modelo incluiu os efeitos fixos de idade do touro, ejaculado (semana de colheita), estação, temperatura máxima média, umidade e a interação entre eles. A morfologia espermática e os dados de integridade de membrana plasmática dos ejaculados foram transformados em raiz quadrada antes da análise. Os coeficientes de correlação de Pearson foram utilizados para analisar a associação entre os parâmetros do sêmen e a idade, estação do ano e dados meteorológicos. O teste de equação de estimação generalizada (GEE – generalized estimation equation) foi utilizado para determinar as diferenças entre as variáveis individuais de qualidade do sêmen (categóricas). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $P < 0,05$. Para testar se as variáveis em estudo assumiam

distribuição normal ou não, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e os dados não sendo normais, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS

Os dados meteorológicos obtidos sobre as condições ambientais nas diferentes estações - temperatura do ar, umidade relativa do ar, radiação solar e pluviosidade, estão apresentados na Tabela 2. Estes resultados apresentaram diferenças estatísticas nos dois períodos - período chuvoso (PCh) e período não chuvoso (PnCh), relacionados com a temperatura, umidade relativa do ar, pluviosidade e radiação solar ($P < 0,01$), com exceção a velocidade do vento, que não apresentou diferença significativa entre períodos ($P > 0,01$).

Tabela 2 – Apresentação das variáveis encontradas nas diferentes estações, no decorrer do presente estudo, com base nos dados obtidos pela Estação Meteorológica WS-GP1 (AT Delta-Devices Ltda, Cambridge, UK) em Santarém - Pará, entre março e novembro de 2016 (média \pm DP). O período chuvoso: março - junho; período não-chuvoso: julho a novembro de 2016.

Estação	Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Pluviosidade (mm)	Radiação solar (W/m ²)	Velocidade do vento (m.s-1)
Período Chuvoso	28,1 \pm 1,8 ^a	89,4 \pm 10,2 ^a	2.418 \pm 309 ^a	232,7 \pm 301,3 ^a	1,6 \pm 0,7 ^a
Período Não-Chuvoso	29,4 \pm 1,9 ^b	79,0 \pm 10,6 ^b	381 \pm 95 ^b	260,6 \pm 314,0 ^b	2,0 \pm 1,0 ^a

a, b Médias com letras sobscritas diferentes dentro de uma coluna foram significativamente diferentes entre as estações ($P < 0,005$).

A Figura 4 mostra a distribuição da temperatura ambiente (em graus Celsius - °C) nos dois períodos (chuvoso e não-chuvoso).

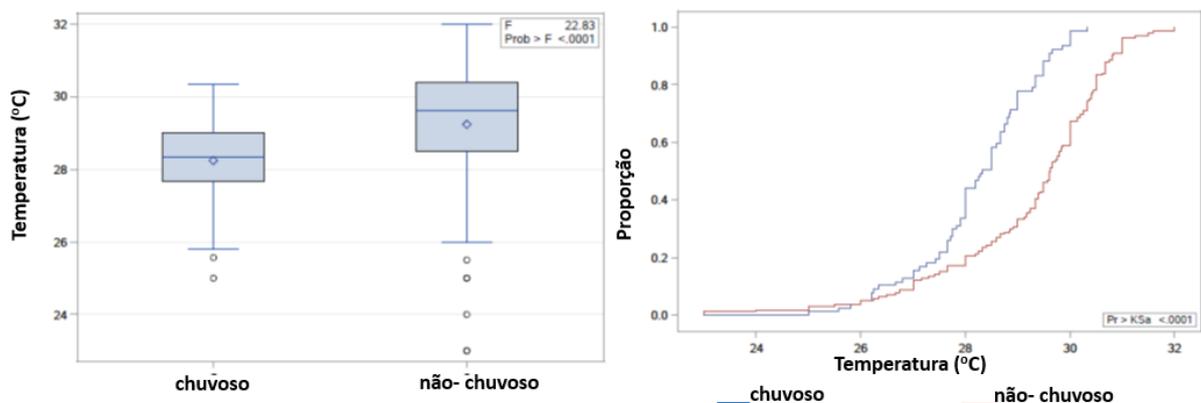


Figura 4 – Apresentação da distribuição de dados de temperatura (°C) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).

A Figura 5 apresenta a distribuição da umidade relativa do ar (%) nos dois períodos (chuvoso e não-chuvoso).

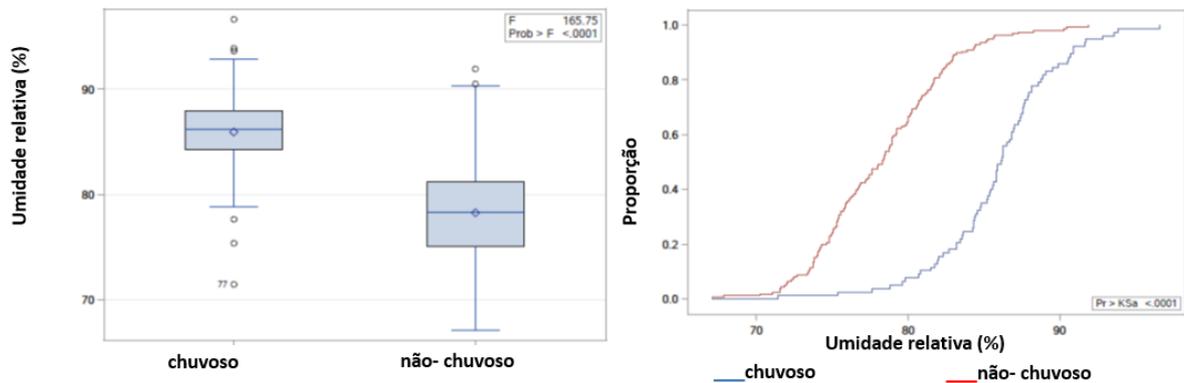


Figura 5 – Apresentação da distribuição de dados de umidade relativa do ar (%) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).

Na Figura 6 identifica-se a distribuição pluviosidade (mm) nos dois períodos (chuvoso e não-chuvoso).

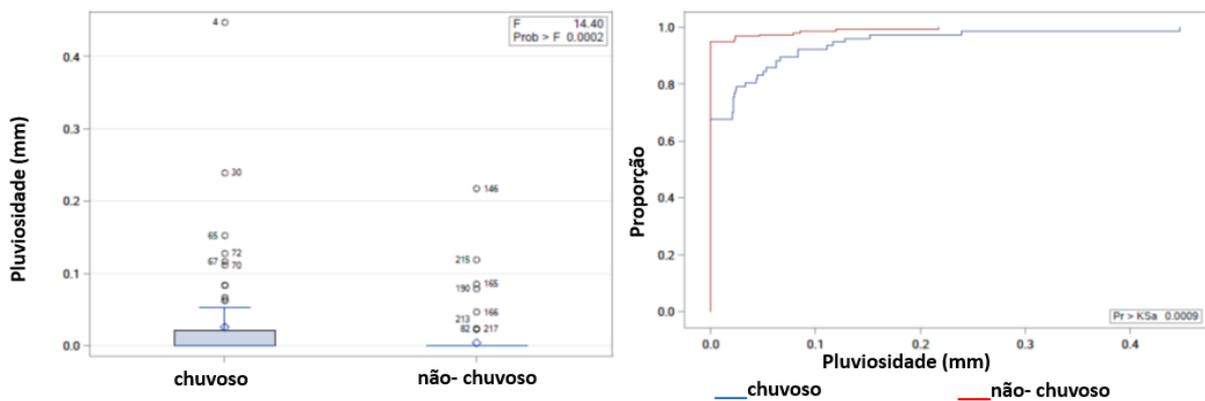


Figura 6 – Apresentação da distribuição de dados de pluviosidade (mm) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).

A Figura 7 mostra a distribuição da radiação solar (w/m^2) nos dois períodos (chuvoso e não-chuvoso).

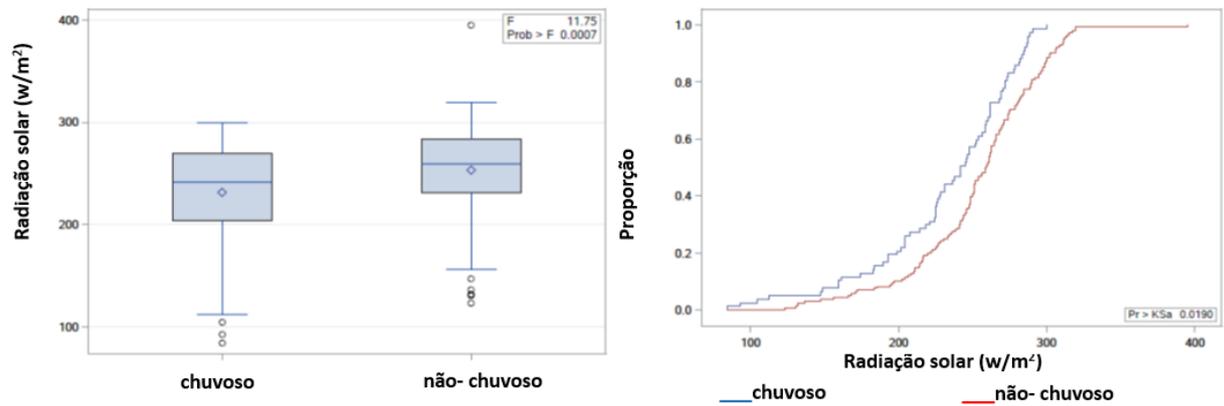


Figura 7 – Apresentação da distribuição de dados de radiação solar (w/m²) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).

A Figura 8 apresenta dados da distribuição da velocidade do vento (m.s-1) nos dois períodos (chuvoso e não-chuvoso).

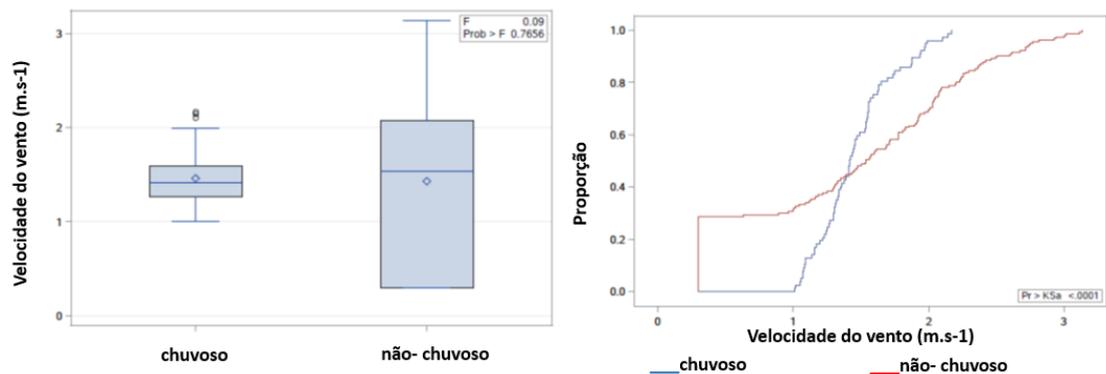


Figura 8 – Apresentação da distribuição de dados de velocidade do vento (m.s-1) entre períodos chuvoso e não-chuvoso (2016).

No tocante as características físicas e morfológicas do sêmen bubalino dos touros no PCh, correspondentes ao volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, concentração, morfologia espermática (determinada por constraste de fase) e integridade de membrana plasmática dos ejaculados, encontram-se tabulados na Tabela 3.

Tabela 3 – Apresentação das características físicas e morfológicas de ejaculados bubalinos, no período chuvoso (março a maio) (n=50). Santarém, Pará, 2016.

Parâmetros Reprodutivos	Animais				
	1	2	3	4	5
Volume (mL)	2,9 ± 1,5	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,8	2,9 ± 1,0	6,7 ± 1,7
Cor	Branca/ branco- amarelada/	Amarelado/ branco/ branco- amarelado	Branco/ branco- marmóreo	Branco/ branco- marmóreo	Branco/ branco- amarelado
Aspecto	Aquoso/ Leitoso	Leitoso	Leitoso	Leitoso	Leitoso
Turbilhonamento (0-5)	4,2 ± 0,8	4,6 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,7 ± 0,6
Motilidade (%)	80,0 ± 4,1	80,0 ± 5,3	75,5 ± 4,4	84,0 ± 3,9	82,5 ± 7,2
Vigor (0-5)	4,5 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,7 ± 0,5
Concentração (x10⁶sptz/mL)	586.000 ± 254.567,2	565.000 ± 116.952	856.000 ± 266.216,3	546.500 ± 188.812,8	733.000 ± 209.833,6
Defeitos maiores (%)	10,1 ± 2,3	10,5 ± 1,9	9,8 ± 1,2	9,7 ± 1,3	5,0 ± 2,1
Defeitos menores (%)	11,4 ± 2,6	11,5 ± 2,1	11,4 ± 6,2	12,8 ± 3,4	9,0 ± 4,2
Defeitos Totais (%)	21,4 ± 3,0	22,0 ± 3,6	21,1 ± 6,3	22,5 ± 4,2	13,9 ± 4,5
Integridade de membrana plasmática (%)	84,1 ± 5,4	90,0 ± 1,9	83,3 ± 5,1	79,5 ± 5,1	87,4 ± 3,9

Pela análise da Tabela 3, pode-se observar que não foram detectadas diferenças estatísticas ($P > 0,01$) quanto a quantidade e a qualidade dos diferentes parâmetros dos ejaculados, em nenhuma das características acima avaliadas. Todos os ejaculados apresentaram-se dentro dos padrões de normalidades descritos para a espécie, segundo Vale (1994); CBRA (2013).

As características físicas e morfológicas do sêmen bubalino no PnCh, correspondentes ao volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, concentração, morfologia espermática (por contraste de fase) e integridade de membrana plasmática dos ejaculados, encontram-se expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Apresentação das características físicas e morfológicas de ejaculados bubalinos, no período não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016.

Parâmetros Reprodutivos	Animais				
	1	2	3	4	5
Volume (mL)	5,6 ± 2,6	2,6 ± 1,2	2,2 ± 0,6	3,9 ± 1,1	5,9 ± 1,6
Cor	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada
Aspecto	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso
Turbilhonamento (0-5)	2,4 ± 1,0	2,9 ± 1,1	3,0 ± 1,1	3,0 ± 0,7	3,8 ± 0,8
Motilidade (%)	58,3 ± 14,6	49,3 ± 12,2	48,3 ± 13,8	64,8 ± 9,0	60,5 ± 9,7
Vigor (0-5)	3,2 ± 0,8	3,3 ± 0,6	3,6 ± 0,6	4,1 ± 0,2	3,4 ± 0,7
Concentração (x10⁶sptz/mL)	342.750 ± 172.813,2	800.000 ± 306.963,1	708.250 ± 287.847,2	477.750 ± 195.740,7	601.250 ± 244.910,7
Defeitos maiores (%)	13,3 ± 2,5	35,2 ± 8,6	26,0 ± 4,9	15,5 ± 3,6	14,2 ± 4,0
Defeitos menores (%)	29,7 ± 5,3	24,1 ± 4,6	25,0 ± 3,4	31,6 ± 8,3	27,2 ± 6,0
Defeitos Totais (%)	43,0 ± 6,2	59,4 ± 8,4	50,9 ± 4,6	47,1 ± 8,2	41,4 ± 6,5
Integridade de membrana plasmática (%)	60,9 ± 9,7	56,7 ± 12,6	62,6 ± 10,5	49,9 ± 15,2	59,2 ± 10,6

As características físicas e morfológicas médias de todos os ejaculados bubalinos descritas por período chuvoso e não-chuvoso estão contidas na Tabela 5. Observa-se que no PCh, as análises seminais obtidas, mostraram ejaculados com volume de 3,4±2,0mL, turbilhonamento de 4,4±0,5, motilidade de 80,4±5,6 %, vigor de 4,4±0,4, concentração de 657.300±237.865,1 x10⁶sptz/mL, defeitos maiores 9,0±2,6%, defeitos menores 11,2±3,9%, defeitos totais 20,2±5,3% e integridade de membrana 84,8±5,6%. Já no PnCh, os resultados obtidos foram de volume 4,0±2,1mL, turbilhonamento de 3,0±1,0, motilidade de 56,2±13,4 %, vigor de 3,0±1,0, concentração de 586.000±291.925,9 x10⁶sptz/mL, defeitos maiores 20,8±9,9%, defeitos menores 27,5±6,3%, defeitos totais 48,3±9,3% e integridade de membrana plasmática de 57,9±12,4%.

Tabela 5 – Apresentação das características físicas e morfológicas médias de ejaculados bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016.

Parâmetros seminais	Período chuvoso	Período não-chuvoso
Volume (ml)	3,4±2,0 ^a	4,0±2,1 ^a
Turbilhonamento (0-5)	4,4±0,5 ^a	3,0±1,0 ^b
Motilidade(%)	80,4±5,6 ^a	56,2±13,4 ^b
Vigor(0-5)	4,4±0,4 ^a	3,0±1,0 ^b
Concentração (x10 ⁶ sptz/mL)	657.300±237.865,1 ^a	586.000±291.925,9 ^a
Defeitos maiores (%)	9,0±2,6 ^a	20,8±9,9 ^b
Defeitos menores (%)	11,2±3,9 ^a	27,5±6,3 ^b
Defeitos totais (%)	20,2±5,3 ^a	48,3±9,3 ^b
Integridade de membrana plasmática (%)	84,8±5,6 ^a	57,9±12,4 ^b

a,b Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre períodos ($P<0,005$).

Ao que se refere ao parâmetro cor dos ejaculados, foram observadas as tonalidades amarelado, branco, branco-amarelado e branco-marmóreo. Enquanto que para o parâmetro aspecto foram observadas as características: aquoso, seroso e leitoso. Para volume no PCh e no PnCh a média foi de 3,4±2,0 e 4,0±2,1, respectivamente. Os dados sobre a concentração, cor, aspecto e volume não apresentaram diferença estatística entre os períodos. Já os valores relativos para a concentração média no PCh e PnCh foram de 657.300±237.865,1 e de 586.000±291.925,9, respectivamente.

Os dados referentes ao turbilhonamento, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e integridade de membrana plasmática, apresentaram diferença significativamente entre os períodos PCh e PnCh ($P<0,01$).

Com relação ao parâmetro turbilhonamento (movimento de massa) no PCh e no PnCh, variaram de 3 a 5, com média 4,4±0,5 e de 1 a 5, com média de 3,0±1,0, respectivamente, porém, não houve variação estatística entre os animais nestes períodos, contudo, houve diferença estatística ($P<0,01$) entre os dois períodos (PCh e PnCh).

No presente trabalho, verificou-se que a motilidade espermática progressiva apresentou decréscimo nos valores durante as diferentes fases do experimento. A motilidade progressiva do sêmen *in natura* variou de 70% a 95%, com média de 80,4±5,6% no PCh e decresceu no PnCh, com colheitas obtidas variando de 20% a 75%, porém com média de 56,2±13,4%. Apresentou também diferença estatística entre os períodos ($P<0,01$).

Quanto ao vigor, tanto no PCh e PnCh, no sêmen *in natura* variou de 4 a 5, com média de $4,4 \pm 0,4$ e 2 a 5, com média de $3,5 \pm 0,6$, respectivamente. Dados diferiram estatisticamente entre os períodos ($P < 0,01$). Gráfico 1 compara resultados de turbilhonamento e vigor, nos dois períodos, respectivamente.

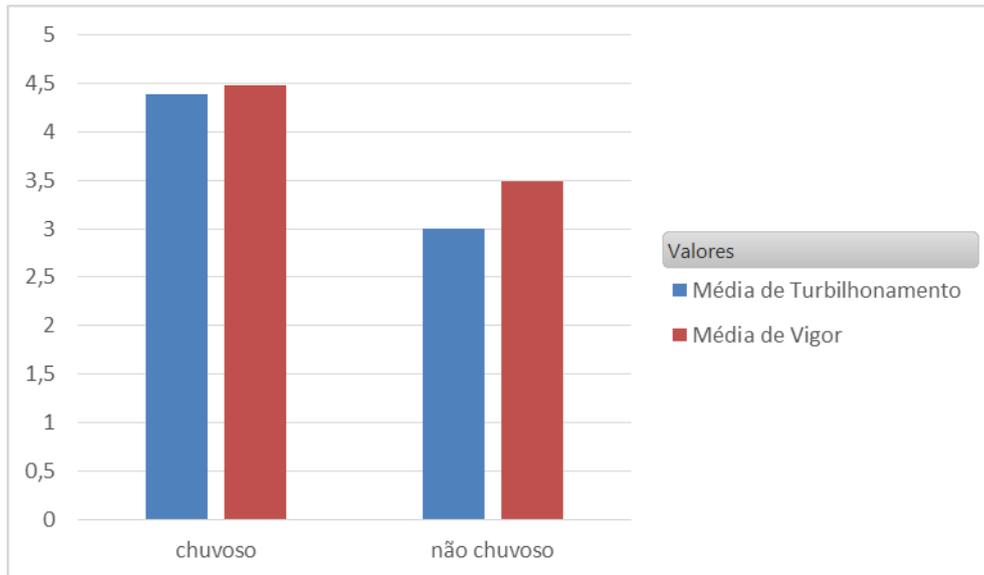


Gráfico 1 – Apresentação das médias de turbilhonamento e vigor de sêmen bubalino, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.

Quanto à morfologia espermática, para defeitos maiores no PCh e PnCh, os dados médios obtidos foram de $9,0 \pm 2,6\%$, variando de 1,5 a 15,0% e de $20,8 \pm 9,9\%$, variando de 10,5 a 50,5%, respectivamente. Para defeitos menores no PCh e PnCh dados médios de $11,2 \pm 3,9\%$, com valores obtidos entre 3,4 a 24,0% e média de $27,5 \pm 6,3\%$, variando de 15,5 a 54,5%, respectivamente. Da mesma forma, para defeitos totais os valores médios obtidos foram de $20,2 \pm 5,3\%$, para o PCh, variando de 7,0 a 32,5%; e dados médios de $48,3 \pm 9,3\%$ no PnCh que variaram de 32,5 a 76,5%, conforme Gráfico 2. Assim, os dados para defeitos maiores, menores e totais, apresentaram diferença estatística entre os períodos PCh e PnCh ($P < 0,01$).

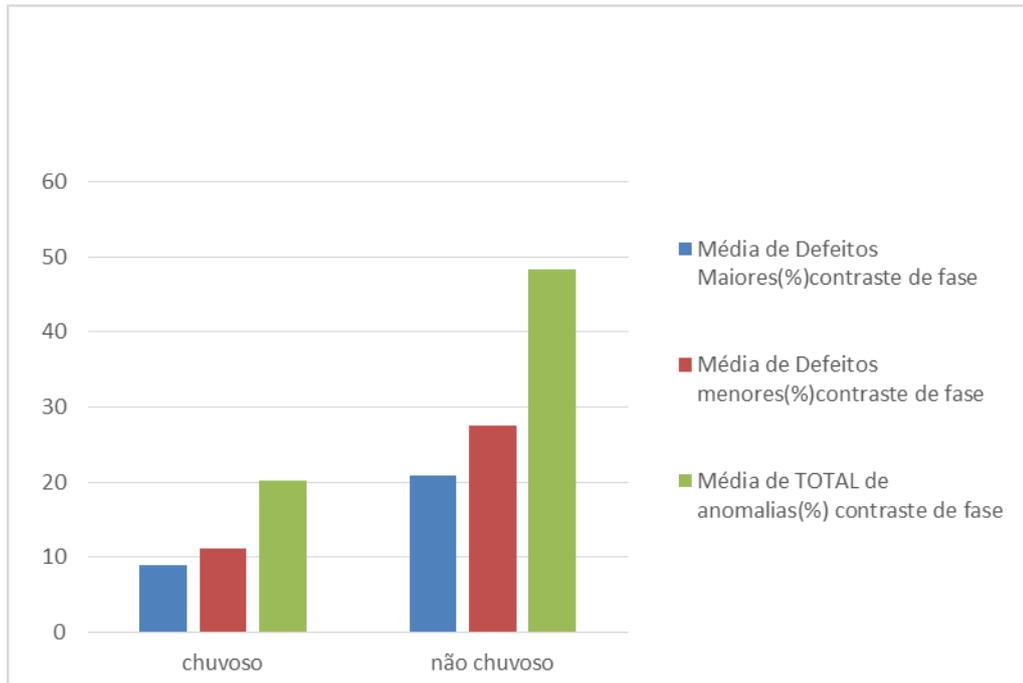


Gráfico 2 – Apresentação das médias de defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e defeitos totais (%) de sêmen bubalino, avaliados em microscopia de contraste de fase, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.

Para avaliação da morfologia espermática, ao comparar as duas técnicas utilizadas, com uso de microscopia de contraste de fase e técnica de coloração pelo corante eosina-nigrosina, verificou-se que as médias de defeitos maiores, menores e totais, foram maiores quando se utilizou o método por contraste de fase, do que por coloração com eosina-nigrosina, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Apresentação da estatística descritiva comparativa para diferentes categorias de defeitos observados no espermograma bubalino, pelos métodos de coloração com eosina-nigrosina e de microscopia de contraste de fase. Santarém, Pará. 2016.

Parâmetros	Eosina-nigrosina (n = 150)			Contraste de fase (n = 150)		
	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)	Anomalias totais (%)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)	Anomalias totais (%)
Média	11,4 ^b	17,6 ^b	29,0 ^b	16,8 ^a	22,1 ^a	38,9 ^a
DP	6,9	8,1	12,3	9,9	9,5	12,3
Mínimo	1,0	3,0	5,5	1,5	3,5	5,5
Máximo	44,0	46,5	62,0	50,5	54,5	62,0

a,b Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Equivalência com Dados Pareados

Com relação a avaliação das patologias espermáticas observadas pelo uso de gota úmida, com uso do microscópio de contraste de fase, apresentou maiores percentuais de

alteração, com diferenças estatísticas significativas ($P < 0,01$), quando comparada a técnica de coloração com eosina-nigrosina.

No tocante a integridade de membrana plasmática, os dados relativos ao PCh foram de $84,8 \pm 5,6\%$, variando de 69,5 a 92,5%. Já no PnCh foi de $57,9 \pm 12,4\%$, com intervalo de 16,0 a 91,5% ($P < 0,01$).

Os resultados relativos aos constituintes bioquímicos (frutose, proteínas plasmáticas totais, albumina, cálcio, fósforo e magnésio) analisados no presente experimento, durante o PCh e PnCh, encontram-se tabelados na Tabela 7.

Tabela 7 – Apresentação dos dados das análises bioquímicas do plasma seminal de bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) ($n=100$). Santarém, Pará, 2016. PPT: proteínas plasmáticas totais; Ca: cálcio; P: fósforo; Mg: magnésio.

Período	Frutose (mg/dL)	PPT (g/dL)	Albumina (g/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Mg (mg/dL)
Chuvoso	$17,1 \pm 5,6^a$	$1,6 \pm 0,5^a$	$0,45 \pm 0,1^a$	$20,6 \pm 2,2^a$	$11,6 \pm 4,6^a$	$2,6 \pm 0,5^a$
Não- Chuvoso	$10,7 \pm 5,6^b$	$1,7 \pm 0,6^a$	$0,3 \pm 0,1^b$	$19,6 \pm 2,3^b$	$7,8 \pm 4,5^b$	$2,7 \pm 0,7^a$

a, b Médias com letras sobrescritas diferentes dentro de uma coluna foram significativamente diferentes entre as estações ($P < 0,005$).

Pela análise dos resultados obtidos pela análise do plasma seminal para frutose (Fru), proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina (Alb), cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg), apresentados na Tabela 7, pode-se observar que Fru, Alb, Ca e P apresentaram diferença estatística significativa entre os períodos ($P < 0,01$), diferentemente de PPT e Mg ($P > 0,01$). Os dados médios para Fru foram de $17,1 \pm 5,6$ mg/dL e $10,7 \pm 5,6$ mg/dL para o PCh e PnCh, respectivamente. Da mesma forma, com relação aos outros componentes estudados, a relação entre PPT foi de $1,6 \pm 0,5$ g/dL e $1,7 \pm 0,6$ g/dL; de Alb $0,45 \pm 0,1$ g/dL e $0,3 \pm 0,1$ g/dL; Ca $20,6 \pm 2,2$ mg/dL e $19,6 \pm 2,3$ mg/dL; P $11,6 \pm 4,6$ mg/dL e $7,8 \pm 4,5$ mg/dL; Mg $2,6 \pm 0,5$ mg/dL e $2,7 \pm 0,7$ mg/dL, para o PCh e PnCh, respectivamente, conforme dados apresentados no Gráfico 3.

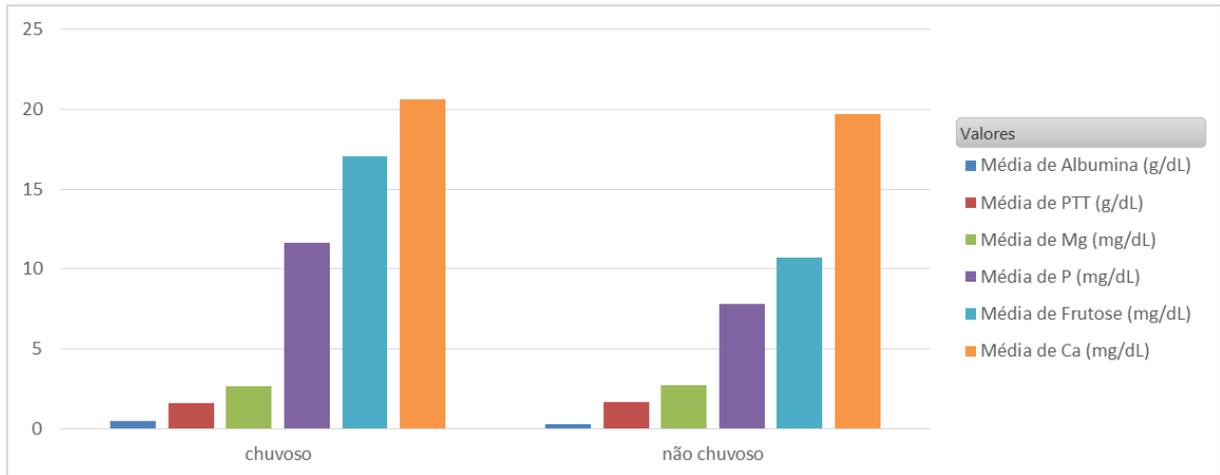


Gráfico 3 - Apresentação das médias das análises bioquímicas do plasma seminal para albumina (g/dL), proteínas plasmáticas totais (PPT) (g/dL), Magnésio (Mg) (mg/dL), fósforo (P) (mg/dL), frutose (mg/dL) e cálcio (Ca) (mg/dL) de sêmen bubalino, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.

Quanto aos dados relativos a morfometria, tais como circunferência escrotal (CE), perímetro torácico (PT) e peso (P), encontram-se sumarizados na Tabela 8. Dados para CE foram de $28,32 \pm 2,3$ cm e $28,28 \pm 1,8$ cm, no PCh e no PnCh, respectivamente sem diferença significativa entre os períodos ($P > 0,01$). Para o PT foram de $189,09 \pm 14,28$ cm e de $187,06 \pm 11,05$ cm, PCh e PnCh, respectivamente, também sem diferença estatística significativa ($P > 0,01$). Da mesma forma que os dados médios para o P, que foram de $477,46 \pm 112,6$ Kg e $473,45 \pm 84,48$ Kg ($P > 0,01$), PCh e PnCh, respectivamente. O gráfico 4 representa os dois períodos estudados.

Tabela 8 – Apresentação dos parâmetros morfométricos médios, coletados semanalmente, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=125). Santarém, Pará, 2016. CE: Circunferência escrotal; PT: perímetro torácico; P: peso.

Período	CE (cm)	PT (cm)	P (Kg)
Chuvoso	$28,32 \pm 2,3^a$	$189,09 \pm 14,28^a$	$477,46 \pm 112,6^a$
Não- Chuvoso	$28,28 \pm 1,8^a$	$187,06 \pm 11,05^a$	$473,45 \pm 84,48^a$

a, b Médias com letras sobrescritas diferentes dentro de uma coluna foram significativamente diferentes entre as estações ($P < 0,005$).

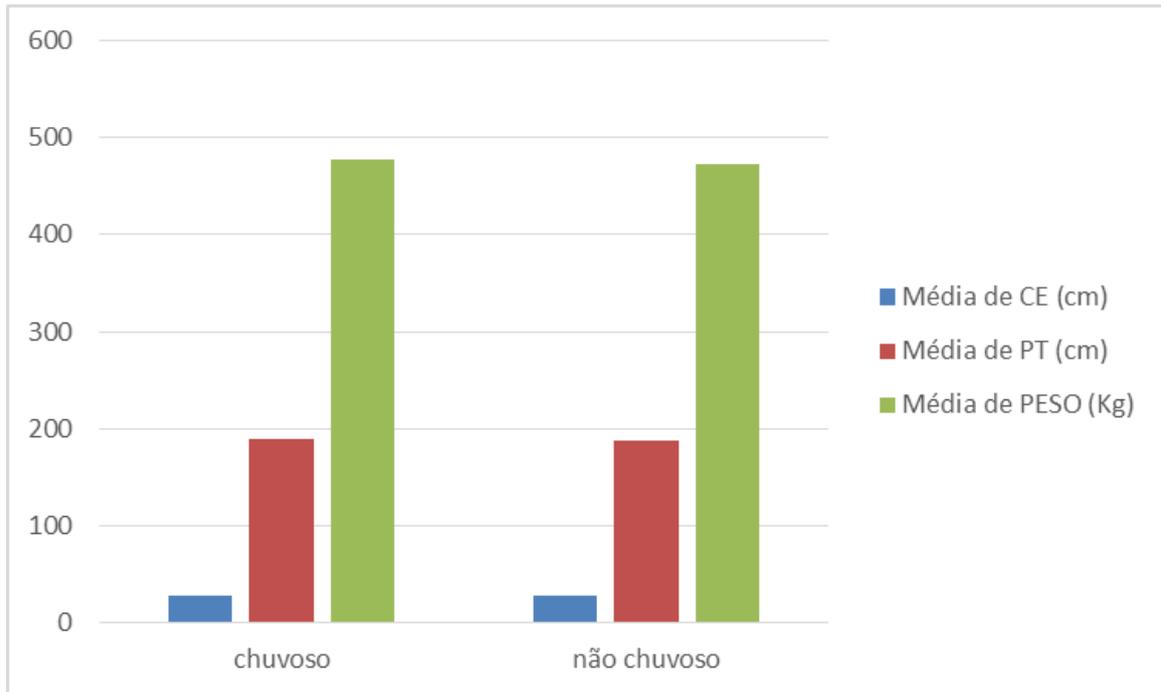


Gráfico 4 - Apresentação das médias de circunferência escrotal (CE) (mm), perímetro torácico (PT) (mm) e Peso (Kg) de touros bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.

Já para os dados relativos aos parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), temperatura superficial na cabeça (TSC), temperatura superficial no torso (TSD), temperatura superficial na virilha (TSV) e temperatura na bolsa escrotal (TSBE) encontram-se sumarizados na Tabela 9. Dados de FC no período chuvoso foram de $54 \pm 10,9$ bpm; no período não-chuvoso foram $48 \pm 11,8$ bpm. Para frequência respiratória no PCh $22 \pm 6,8$ mpm e no PnCh de $23 \pm 6,7$. Dados de TR, no PCh foram de $38,3 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$; PnCh $38,2 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$. Para dados de TS, na região de cabeça foram $33,3 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ no PCh e $36,2 \pm 2,4^{\circ}\text{C}$ no PnCh; na região do dorso $33,6 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ no PCh e $35,1 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ no PnCh; na virilha $32,3 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ no PCh e $34,6 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ no PnCh e bolsa escrotal $30,3 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ no PCh e $32,3 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ no PnCh, conforme dados representados no Gráfico 5. Dados de frequência cardíaca, temperatura superficial (cabeça, dorso, virilha e bolsa escrotal) diferiram estatisticamente entre os períodos ($P < 0,01$). Dados de frequência respiratória e temperatura retal não diferiram entre os períodos ($P > 0,01$).

Tabela 9 – Apresentação dos parâmetros fisiológicos médios, antes das colheitas de sêmen de bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=100). Santarém, Pará, 2016. FC: Frequência cardíaca; FR: frequência respiratória; TR: temperatura retal; TS: temperatura superficial.

Período	FC	FR	TR	TSC	TSD	TSV	TSBE
Chuvoso	54 ± 10,9 ^a	22 ± 6,8 ^a	38,3 ± 0,8 ^a	33,3 ± 2,5 ^a	33,6 ± 2,1 ^a	32,3 ± 2,2 ^a	30,3 ± 2,0 ^a
Não-Chuvoso	48 ± 11,8 ^b	23 ± 6,7 ^a	38,2 ± 0,8 ^a	36,2 ± 2,4 ^b	35,1 ± 2,1 ^b	34,6 ± 2,2 ^b	32,3 ± 2,0 ^b

a, b Médias com letras sobrescritas diferentes dentro de uma coluna foram significativamente diferentes entre as estações ($P < 0,005$).

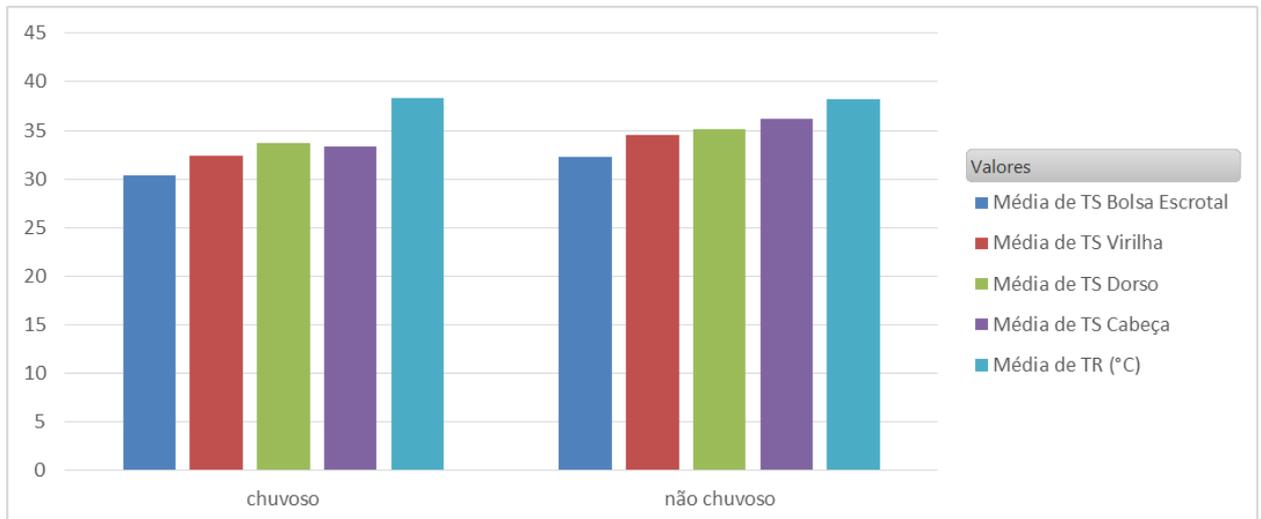


Gráfico 5 - Apresentação das médias de temperatura de superfície (TS) (°C) de testículos, virilha, dorso e cabeça e temperatura retal (°C) de touros bubalinos, no período chuvoso (março a maio) e não-chuvoso (agosto a novembro) (n=150). Santarém, Pará, 2016.

6. DISCUSSÃO

Durante mais de meio século, o processo de integração econômica da Amazônia tem sido baseado no uso intensivo de recursos naturais renováveis e não-renováveis, o que vem implicando em importantes alterações ambientais em toda a região. O desenvolvimento rural na Amazônia empurrou a fronteira agrícola brasileira rapidamente, resultando em uma mudança generalizada na cobertura da terra, onde os sistemas de produção agropecuários foram estabelecidos, e em alguns casos tornaram-se sustentáveis e de produtividade econômica aceitável. Dentro desse contexto, o clima e o meio ambiente regional tem uma grande importância dentro do planejamento de qualquer programa de ciência e tecnologia a ser implementado. Assim, no aspecto relacionado com a produção de animais domésticos, o clima e o meio ambiente tem um papel primordial e ditam diretamente o sucesso ou fracasso de qualquer empreendimento a ser projetado (FEARNSIDE, 2005).

Assim, no presente estudo, desde o início do seu planejamento, foi detectada a necessidade da utilização de dados precisos sobre esses fenômenos naturais e, para isso, foi implantado junto com o projeto uma unidade paralela para a colheita desses importantes dados. Portanto, para dar o devido suporte ao estudo, uma mini-estação meteorológica modelo WS-GP1 Weather Station, (AT Delta-Devices Ltda) foi instalada no local do experimento, para aferir temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$), porcentagem de umidade relativa do ar, pluviosidade (mm), radiação solar (W/m^2) e velocidade do vento (m.s^{-1}), junto a área do experimento, nas proximidades onde os touros bubalinos estavam estabulados. Devido aos níveis máximos médios distintos de temperatura ambiente, chuva e umidade, para os fins do presente estudo, conforme literatura, o ano foi dividido em duas estações: (i) a estação chuvosa: Dezembro- Junho - período chuvoso (PCh); (ii) a estação não chuvosa: Julho- Novembro - período não chuvoso (PnCh).

As variáveis tabuladas no decorrer das diferentes estações do presente estudo, com base nos dados obtidos pela Estação Meteorológica WS-GP1, em Santarém - Pará, entre março e novembro de 2016 (média \pm desvio padrão), encontram-se descritas na Tabela 2 e nas Figuras 4, 5, 6, 7 e 8. As variáveis tabuladas no decorrer das estações do presente estudo, mostraram que os dois períodos diferem estatisticamente. Ocorreu uma ligeira variação na temperatura ambiental no PCh e no PnCh, havendo contudo uma diferença estatística significativa ($P < 0,01$), uma das variáveis que pode ter influenciado negativamente na

qualidade seminal. Da mesma forma ocorreu com a umidade relativa do ar que no PCh foi maior que no PnCh ($P < 0,01$). Como era de se esperar, a pluviosidade foi marcante no PCh enquanto foi reduzida no PnCh. No tocante a radiação solar, esta foi de menor intensidade no PCh quando comparado ao PnCh. Entretanto, na velocidade do vento, houve uma menor intensidade no PCh em comparação ao PnCh, porém sem diferença estatística entre os períodos ($P > 0,01$). Estas características ambientais, pode nos levar a prever que as variáveis contribuíram significativamente para que no PnCh houvesse um decréscimo na qualidade seminal.

Existem na literatura muitas citações sobre a capacidade dos búfalos de se adaptarem aos climas quentes e úmidos, em especial aos de predominância em terrenos alagados e com áreas pantanosas, como os que predominam na região Amazônica. Entretanto, quando exposto à radiação solar direta são facilmente acometidos de estresse térmico com perda significativa nas suas funções fisiológicas (VALE, 2007; MARAI e HAEEB, 2010). Tal aspecto ocorre devido o fato do búfalo absorver grande quantidade de radiação solar sobre a sua massa corporal, que apresenta a pele escura e o pelo ou cabelo escasso, e além de que possuem menos glândulas sudoríparas, o que contribui para o sistema de resfriamento evaporativo corporal menos eficiente devido à sua capacidade de transpiração ser bastante reduzida (SHAFIE, 1985; VALE, 2007).

Por ser um mamífero, e portanto endotérmico, o sistema de termo-regulação do búfalo funciona tipicamente a temperaturas corporais de núcleo elevadas que variam desde aproximadamente 35 °C a 39 °C (PROSSER e HEATH, 1991). Estas temperaturas elevadas, que geralmente excedem a temperatura do meio ambiente circundante, provém da combustão de materiais combustíveis para atingir uma taxa metabólica elevada (isto é, a produção de calor). Como a temperatura corporal é rigorosamente regulada pela adequação da produção de energia que gera calor, há necessidade constante da perda de calor corporal ao ambiente, que ocorre através da condução, convecção, radiação e evaporação. Assim sendo, a temperatura de ajuste para a regulação da temperatura corporal não é fixa, e pode variar diurnamente ou, em alguns animais, como parte da resposta à hibernação ou em resposta a mudanças na temperatura ambiental ou pela deficiência de um manejo adequado (JÖCHLE e LAMOND, 1980).

Assim como em todos os mamíferos endotérmicos, o búfalo em particular, sofre exposição do estresse térmico nos climas tropicais, quer pela exposição contínua as intemperes da radiação solar, ou pela imposição de um manejo deficiente. Portanto, para o

búfalo essas condições evocam uma série de mudanças drásticas nas funções biológicas que incluem depressão na ingestão, eficiência e utilização dos alimentos, perturbações no metabolismo proteico, energético e hidro-mineral, bem como, alterando reações enzimáticas, secreções hormonais e dos metabólitos do sangue. Tais mudanças resultam em efeitos deletérios sobre o crescimento, produção e desempenho reprodutivo. Ademais, o efeito do estresse térmico é agravado quando é acompanhado pelo aumento da umidade do ambiente. Assim sendo, a temperatura corporal do búfalo sobre as intemperes do sol quente do clima tropical úmido, só pode ser mantida normal à sombra ou por meio de uma aplicação quase contínua de água, de preferência em lagos ou duchas permanentes, onde os búfalos esfriam rapidamente, talvez pelo fato de sua pele enegrecida, rica em vasos sanguíneos, conduzir e irradiar calor eficientemente. Observações tem demonstrado, que o hábito de se chafurdar ou se espojar em áreas elameadas, não é tão eficiente como que manter os animais com sombreamento ou com banhos nas horas mais quentes. Tal premissa, leva a se afirmar que os búfalos nas condições de clima tropical amazônico, se resfriam mais rapidamente que os bovinos (VALE, 2007; VALE e RIBEIRO, 2009; VALE et al., 2013).

O estresse térmico pode levar a interrupções nos processos reprodutivos através de dois mecanismos gerais. Em primeiro lugar, causando uma falha nos mecanismos homeocinéticos presentes no organismo animal, capazes de regular a temperatura corporal que pode comprometer a função reprodutiva. Um exemplo clássico desse mecanismo, é a redistribuição do fluxo sanguíneo do núcleo do corpo para a periferia para aumentar a perda de calor sensível. Um outro mecanismo homeocinético de controle da temperatura corporal ocorre pela redução na ingestão de alimento durante o estresse provocado pelo calor. Ao reduzir a ingestão de alimentos, se reduz a produção de calor metabólico, mas também pode se levar a alterações no equilíbrio energético e na disponibilidade de nutrientes que podem ter grandes efeitos sobre os aspectos reprodutivos como a ciclicidade, o estabelecimento da prenhez e o desenvolvimento fetal na fêmea, como a perda da libido e distúrbios na espermatogênese nos machos (JÖCHLE e LAMOND 1980; VALE, 2007).

Um segundo mecanismo para a interrupção da reprodução durante o estresse térmico é a falha dos sistemas homeocinéticos para regular a reprodução, posto que o aumento da temperatura corporal em torno de seu ponto de ajuste regulado, pode comprometer a função das células germinativas, da fertilização, da competência do oócito e da capacidade do embrião no seu desenvolvimento inicial e talvez de outras células envolvidas na reprodução da fêmea e na total incapacidade da espermatogênese se processar normalmente, desde a fase

de espermatogônia até a produção de espermatozóides viáveis nos túbulos seminíferos (JÖCHLE e LAMOND 1980; GRUNERT, BIRGEL e VALE, 2005; VALE, 2007; HANSEN, 2009).

Desta forma, ao se realizar o presente estudo, visando o conhecimento de componentes importantes ligados a reprodução de reprodutores bubalinos na mesorregião do Baixo Amazonas, procurou-se imputar os efeitos do clima tropical úmido regional, sobre os aspectos reprodutivos do ejaculado dos animais utilizados, bem como aspectos morfométricos e fisiológicos que possivelmente pudessem interferir na qualidade desses ejaculados obtidos nas duas estações climáticas existentes na região. Entretanto, devemos chamar atenção para o fato de que os animais utilizados no referido experimento receberam estabulação permanente, assim como, dois banhos diários, no período matutino e vespertino, onde buscou-se exatamente atenuar os efeitos do estresse térmico provocado, especialmente, pelo aumento da temperatura ambiental e um possível efeito da radiação solar sobre os animais experimentais. Como pode-se observar na Tabela 2, no PnCh, a temperatura e umidade relativa do ar foram elevadas, quantidade de radiação solar aumentou consideravelmente, bem como declínio na pluviosidade. Mesmo com este manejo especial, ocorreu declínio na qualidade dos ejaculados no período não-chuvoso.

É por causa de suas características morfológicas e anatômicas, que o búfalo é tão bem adaptado para climas quentes e úmidos e terreno lamacento. Além disso, a pele de búfalo é coberta com uma epiderme espessa, cujas células basais contêm muitas partículas de melanina que dão à superfície da pele sua característica de cor preta. As partículas de melanina prendem os raios ultravioletas e impedem que eles penetrem através da derme da pele para o tecido inferior. Estes raios são abundantes na radiação solar nos trópicos, porém com exposição excessiva do tecido animal, poderia ser prejudicial (SHAFIE, 1985).

Portanto, deve-se considerar que as condições climáticas ideais para o sistema de produção de búfalos é a existência de uma temperatura ambiental entre 13 e 18°C, associada à umidade relativa do ar média entre 55 e 65%, insolação de média intensidade e velocidade do vento entre 5 e 8 km/h (MARAI e HAEEB, 2010; GARCIA, 2013). Assim sendo, com base na literatura compulsada é de se prever que as características climáticas favoráveis parecem não ocorrer na grande maioria dos países onde o búfalo é criado, pode-se afirmar que um dos problemas principais da não adaptação dos búfalos ao clima tropical seria relacionado ao estresse térmico .

Nas regiões temperadas do mundo, verificou-se que o sêmen é de melhor qualidade durante o inverno e a primavera, do que no verão e outono (GALLI et al., 1993; MOHAN e SAHNI, 1990; SANSONE et al., 2000). Nas regiões tropicais, observou-se uma qualidade do sêmen satisfatória durante a estação chuvosa. Na região tropical quente e úmida da Amazônia, o melhor momento para obter sêmen é entre janeiro e junho, conforme relatado por Vale (1994). Por isso, o presente experimento, buscou comprovar a diferença entre períodos na qualidade seminal de búfalos, em especial na mesorregião do Baixo Amazonas, onde não há nenhum relato. Assim sendo, os búfalos são muito sensíveis ao estresse térmico, portanto, subentende-se que um declínio na qualidade do sêmen seria esperado durante a estação quente do ano. Porém, quais seriam os parâmetros que realmente declinariam é que são importantes de discutir.

No presente experimento, os períodos foram classificados em chuvoso e não-chuvoso, conforme características regionais e dados obtidos pela estação meteorológica. Assim, constatou-se que o sêmen bubalino sofre sim influência do meio-ambiente, porém não em todos os parâmetros estudados. Também parâmetros fisiológicos e morfométricos variam de acordo com os períodos, entretanto também não são todas as características que declinam no período não-chuvoso.

Para a análise dos resultados obtidos no presente experimento (Tabelas 2, 3 e 5), os mesmos encontram-se de acordo com os dados tabulados por Bhakat et al. (2015) que obtiveram ejaculados com melhores características reprodutivas nos períodos de temperaturas mais amenas do ano. Concluíram também, que nos meses mais quentes os ejaculados são afetados negativamente em várias características.

No trabalho de Sharma et al. (2014), apresentou diferenças estatísticas durante o ano, porém os autores classificaram os períodos em verão, inverno e chuvoso. Diferentemente da região experimental que fora classificada em período chuvoso e não-chuvoso. Ao comparar as características físicas e morfológicas médias de todos os ejaculados bubalinos descritas no período chuvoso e não-chuvoso no presente experimento, com os dados dos autores citados, observaram-se algumas diferenças importantes. Para volume, os dados do período chuvoso indiano foram inferiores ao período chuvoso do presente experimento. Dados de turbilhonamento do presente experimento foram superiores aos dados dos outros períodos que os autores relataram. Para a motilidade e a integridade de membrana plasmática, os dados foram superiores no período chuvoso em comparação ao dos autores, porém, no período não-chuvoso, inferiores aos do inverno e verão relatados na Índia.

Assim como para Sharma et al. (2014), a motilidade progressiva do sêmen foi significativamente maior na estação chuvosa do que no verão e no inverno. Bhosrekar et al. (1992) e Javed et al. (2000) também relataram valores mais elevados de motilidade progressiva de espermatozóides em épocas de chuvas em búfalos Nili-Ravi e búfalos Surti, respectivamente, corroborando com os dados do presente estudo.

Em experimento de Koonjaenak et al. (2007), na Tailândia, as colheitas de sêmen foram realizadas entre inverno e primavera, quando as temperaturas estavam amenas. Para búfalos esse período foi considerado mais propício para a colheita de sêmen, destinado ao congelamento, uma vez que os ejaculados coletados nesses meses do ano apresentaram maior integridade e estabilidade de membranas, além de melhores valores para os padrões de velocidade fornecidos pelo CASA, para as amostras descongeladas, não sendo observado prejuízo para a qualidade dos ejaculados. Os mesmos autores, não observaram diferenças significativas nas características seminais nos diferentes períodos sazonais, em ejaculados de touros bubalinos, com exceção de defeitos de cauda (morfologia), que aumentaram nos meses de temperaturas mais elevadas. Diferentemente do que ocorreu no presente experimento, em que houveram diferenças estatísticas significativas para os dados de motilidade, vigor, turbilhonamento, integridade de membrana plasmática, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais ($P < 0,01$), conforme Tabela 6.

Sansone et al. (2000) relataram que o fotoperíodo é um importante fator que influencia as características seminais de búfalos. Assim, como Vale (1997), reportou a influência do meio ambiente tropical úmido da Amazônia, na reprodução e atividade sexual de touros búfalos, não apenas na libido, mas na qualidade e congelabilidade do sêmen. Assim, os resultados encontrados por esses autores corroboram os dados encontrados na presente pesquisa, em que o meio ambiente influencia nas características seminais de bubalinos.

Em búfalos adultos, existe uma variação da qualidade seminal em função da época do ano, o que pode ser atribuído, principalmente, a um efeito da temperatura do meio ambiente sobre o animal e, conseqüentemente, sobre a espermatogênese. Gangwar (1980), já relatara que, durante os meses de verão, a porcentagem de espermatozóides vivos em ejaculados de búfalos adultos é de $64,6 \pm 4,4\%$, deliberadamente inferior aos dados alcançados no outono, inverno e primavera, quando se obtêm valores de $90,5 \pm 0,8\%$, $84,5 \pm 2,3\%$ e $95,7 \pm 1,5\%$, respectivamente.

O trabalho de Coimbra (2002) avaliou as características seminais de doadores de sêmen zebuínos, taurinos e bubalinos, mantidos em central de inseminação artificial no Estado do Pará, no trópico úmido amazônico. A fim de realizar a comparação, foram agrupados os dados de seis anos consecutivos sobre os ejaculados coletados durante a estação mais chuvosa do ano (janeiro a junho) e durante a estação menos chuvosa (julho a dezembro). Os touros bubalinos apresentaram diferenças na qualidade seminal, sempre favorável aos ejaculados produzidos no período mais chuvoso do ano, assim como no presente experimento. A motilidade espermática foi o atributo que apresentou diferenças, tanto no sêmen *in natura* ($74,20 \pm 9,87\%$ versus $70,17 \pm 9,89\%$), quanto após a diluição ($75,62 \pm 6,95\%$ versus $73,12 \pm 8,17\%$) e após a descongelação ($54,50 \pm 9,68\%$ versus $49,30 \pm 10,74\%$). Entretanto, não foram observadas diferenças entre estações para as características de volume seminal, concentração espermática, turbilhonamento, vigor e defeitos espermáticos (maiores, menores e total). Já no presente experimento, apenas não houve diferença estatística significativa para volume, cor, aspecto e concentração espermática.

Assim, pode-se afirmar que os períodos do ano influenciaram nas características seminais, visto que no período de maior conforto térmico, a qualidade seminal foi superior. Meses mais quentes influenciaram negativamente na qualidade seminal, enquanto que nos mesmos animais, em meses chuvosos, obtiveram melhores características seminais. O que foi observado no presente estudo, Tabela 3, 4 e 6.

O manejo dos búfalos, incluindo alimentação e instalações, bem como a idade do macho, também têm influência na produção e na qualidade do sêmen (CHINNAIYA e GANGULI, 1990). O sêmen de melhor qualidade, com relação à morfologia espermática, foi observado em touros Murrah de 3 a 5 anos de idade (KUMAR et al., 1994, CHINNAIYA e GANGULI, 1990) e em touros de búfalo Nili-Ravi (SAEED et al., 1990).

No presente trabalho, os resultados do sêmen *in natura* estão de acordo com as características de normalidade descrito para sêmen bubalino descritas por Vale (1994); Vale (2002) e CBRA (2013), após colheita por vagina artificial, com volume mínimo de 3 mL, vigor mínimo de 3, motilidade superior a 70%, integridade de membrana plasmática acima de 70% e defeitos totais não superiores a 30%, obtidos no decorrer do PCh do presente experimento.

Segundo Vale (1994; 2002), um ejaculado bubalino de boa qualidade apresenta volume que varia de 1,0 a mais de 3,0 mL, concentração espermática de 600 a 1,200 milhões de espermatozoides por mL (VALE, 2011), turbilhonamento mínimo de 3 (escala de 0 a 5),

motilidade espermática entre 60 e 80%, vigor de pelo menos 3 (escala de 0 a 5) e pH entre 6,5 e 7,2; dados similares obtidos no PCh do presente experimento. Já Barnabe (1999) cita que os padrões mínimos para a classificação de uma amostra “provavelmente fértil” de sêmen de búfalo são: 500 milhões de espermatozoides por mL, mais de 60% de espermatozoides móveis com progressão retilínea e mais de 70% de espermatozoides com morfologia normal.

Segundo alguns autores como Vale (1994; 2002); Javed et al. (2000); Pant et al. (2003); Ohashi e Baruselli (2008), estão de acordo que o volume do sêmen de búfalos varia de 2 a 3 ml para animais jovens na faixa etária de dois a três anos de idade e de 4 a 6 ml para animais acima de quatro anos, com concentração variando de 0,8 a 1,5 x 10⁹ espermatozoides/mL e motilidade de 70-80%, aspectos estes também observados no presente estudo.

Quanto a coloração, o ejaculado normal do búfalo tem coloração branco-leitoso a acinzentado, raramente ultrapassa 5 mL, conforme Jainudeen e Hafez (2004). Os mesmos autores afirmaram que a concentração espermática fica entre 300 e 1,500 milhões de células por mL.

Os dados de motilidade progressiva média do sêmen *in natura* obtidos neste trabalho foram superiores aos descritos por Barnabe et al. (1994), que relataram valor médio de 75,0%. Foram, também, superiores aos parâmetros mínimos desejáveis recomendados pelo CBRA (2013) para sêmen *in natura*, ou seja, motilidade progressiva de 70%, vigor 3, turbilhonamento 3 e total de espermatozoides anormais de 30%, muito embora esses parâmetros sejam extrapolados da espécie bovina para bubalina. Os excelentes indicadores observados no sêmen *in natura* no presente estudo, parecem estar relacionados, entre outros aspectos, ao rigor experimental empregado na seleção dos touros doadores e seus ejaculados.

Como o PnCh influencia negativamente a qualidade seminal, deve-se buscar nesse período melhorar o conforto térmico dos animais para utilizá-los em programas de colheita de sêmen, para congelamento.

Nas regiões onde ocorre a predominância de temperatura tropical, como na região Amazônica, com clima tropical úmido, há necessidade de se implementar um manejo especial. Assim, é recomendado, a possibilidade dos animais terem acesso a banhos diários, em especial nas horas mais quentes, que pode ser feito com chuveiros especiais, duchas ou lagos, para que os mesmos possam dissipar o calor corporal proveniente do metabolismo e o causado pelo meio ambiente adverso. Por ser mais sensível ao calor, atenção especial deve ser dada a animais submetidos a colheita de sêmen durante a estação mais quente do ano. É muito

importante a proteção dos animais contra o estresse térmico, proporcionando o acesso livre do animal a banho e a sombra, já que essa espécie tem maior dificuldade de dissipar o calor corporal, por possuir menor quantidade de glândulas sudoríparas e, portanto um sistema termorregulador menos eficiente quando comparado aos bovinos e zebuínos. Deve-se salientar que, os animais do experimento receberam manejo especial, que incluía banhos diários, porém, tal estratégia não foi suficiente para evitar o declínio da qualidade do ejaculado no período não-chuvoso.

O efeito negativo da temperatura ambiente sobre a qualidade seminal pode ser resultante da indução de degeneração testicular e elevação da temperatura ambiente com conseqüente estresse térmico (NASCIMENTO e SANTOS, 2003; AHMED et al., 2016). As alterações seminais observadas no presente experimento, levam a corroborar essa afirmação.

Segundo o grupo de trabalho de andrologia bovina para revisão do “Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal”, instituído pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 2009), recomendam-se para ejaculados de touros: espermatozoides normais – o valor mínimo é de 70%. Esta é a característica isolada que tem maior importância para a fertilidade de ejaculados de búfalos no rebanho; defeitos maiores – o valor máximo de tolerância é de até 20%. O rigor ou tolerância na interpretação dessa característica deve levar em consideração o quadro clínico e espermático do animal e inclusive a distribuição dos defeitos individuais; defeitos menores – o valor máximo de tolerância é de até 30%, respeitado o limite de 70% de normais e inclusive a distribuição dos defeitos individuais. Desta forma, chamamos a atenção para o fato de que todos os parâmetros observados na estação chuvosa foram superiores aos recomendados pelo manual (BRASIL, 2009).

No presente experimento para avaliação da morfologia espermática, duas técnicas foram utilizadas: esfregaço corado e examinado em microscópio de campo claro e preparação úmida examinado em microscópio de contraste de fase. Alguns autores ainda utilizam, nas avaliações de rotina das características morfológicas dos espermatozoides, uma ou outra dessas técnicas (SANSONE et al., 2000; FRENEAU, 2011; CBRA, 2013; SHARMA et al., 2014; SHAHZAD et al., 2016). Entretanto, neste experimento ressaltou-se a importância da utilização da técnica de microscopia de contraste de fase, em comparação a com coloração de EN.

Como o espermatozóide é uma célula translúcida, sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular, por isso, quando se

dispõe somente de microscopia óptica comum deve-se fazer uso da técnica de esfregaço corado (ARRUDA et al., 2011). O método de lâmina corada com EN ainda é muito utilizado, devendo-se tomar alguns cuidados na sua preparação, como garantir esfregaços delgados, realizados com o auxílio de outra lâmina com inclinação de 45°. Assim, a eosina ao penetrar pela membrana lesionada dos espermatozóides cora o interior do núcleo em vermelho, identificando os espermatozóides mortos. É considerada uma técnica rápida, de fácil manipulação o que dispensa o uso de microscópio especial (KER, 2010; CBRA, 2013; KUMAR et al., 2016). Já na técnica de câmara úmida, os espermatozóides não são corados, é colocada uma gota de sêmen, imerso em solução tamponada, entre lâmina e lamínula, devendo ser utilizada microscopia que seja capaz de evidenciar os contornos celulares, como a microscopia de contraste de fase (MENEGASSI, 2010; CBRA, 2013; SHARMA et al., 2014; HUSNA et al., 2016).

A diferença entre os resultados das duas técnicas deste experimento, indicam que o método de coloração com EN pode gerar falsos negativos. O que aprovaria amostras que não estão de acordo com as normas do CBRA.

Freneau et al. (2010) compararam a morfologia espermática dos ejaculados dos mesmos touros com duas técnicas, lâmina úmida e contraste diferencial de interferência de fase (DIC) e esfregaço corado com EN, quando verificaram diferenças significativas entre os defeitos maiores e menores, porém não sobre os totais. EN apresentou menor porcentagem de defeitos maiores.

Portanto, é de extrema importância a escolha da técnica a ser empregada devido ao fato de que o esfregaço de lâmina corada pode dar resultados insatisfatórios, se o objetivo for trabalhar com a capacidade andrológica ou monitorar determinado estado de disfunção na espermatogênese. Preferivelmente, recomenda-se a preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou de contraste diferencial de interferência de fase. Esfregaços corados apresentam menor acuidade em decorrência de aumento dos artefatos de técnica aumentando os defeitos de cauda, peça intermediária, cabeça isolada e, por outro lado, subvalorização de alguns defeitos maiores, tais como de acrossoma, vacúolos e gotas, etc. (FRENEAU et al., 2010).

Estudos relatam que quanto aos esfregaços corados, este tipo de análise é imprecisa, mesmo quando executada por investigadores experientes, as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na

implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2004, 2005, 2006, CELEGHINI, 2005; ARRUDA et al., 2011).

Segundo o CBRA (2013), a amostra de sêmen avaliada, deverá apresentar defeitos maiores até 10%, defeitos menores até 20% e defeitos totais até 30%. Acima disso, será reprovada.

Quando comparam os dados obtidos pelo teste hiposmótico e pela coloração com EN, os valores de integridade de membrana observados no HOST foram numericamente superiores aos obtidos pela técnica de EN. Assim, presume-se que o teste hiposmótico e a técnica de coloração pela eosina-nigrosina possuem capacidades distintas de diagnóstico.

A coloração com EN depende de realização de esfregaço, homogeneização perfeita entre sêmen e corantes, e execução de procedimentos tintoriais, o que implica em uma série de intervenções sobre as amostras. Já o teste hiposmótico é de execução mais simples e rápida, apresentando menos intervenções técnicas sobre as amostras. Além disso, quando a célula é exposta a condições hiposmóticas, há a entrada da solução através da membrana plasmática para o meio intracelular, até ocorrer o equilíbrio osmótico, sendo que esse processo ocorre somente nas células que possuem a membrana plasmática íntegra (BARROS et al., 2007).

Como o teste de HOST tem como marcador uma alteração morfológica bem evidente (curvatura da cauda espermática) ao invés de uma característica tintorial, sua precisão pode ser maior que a do teste de EN. Ademais, a visualização celular à microscopia de contraste de fase realizada no HOST permite maior detalhamento celular que a microscopia óptica, usada no teste de EN. Por isso, o teste hiposmótico tem sido utilizado em diversas espécies animais e é importante para diagnosticar alterações de funcionalidade espermática, as quais não seriam percebidas apenas nas avaliações de motilidade e morfologia espermáticas (RASUL et al., 2000; BARROS et al., 2007).

Evidentemente o conhecimento de outros componentes do ejaculado, são importantes para a avaliação clínica e reprodutiva dos machos nas diferentes espécies domésticas. Desta forma, a fertilidade de um reprodutor depende de uma série de fatores que variam desde o comportamento sexual do animal, as condições clínicas e as características ligadas diretamente ao ejaculado. O ejaculado é originado do trato genital masculino dos machos e nos ruminantes domésticos, como o búfalo apresenta a porção celular denominada de sêmen, composto pelos espermatozoides, produzidos nos túbulos seminíferos, que estão suspensos nas secreções fluídas das glândulas sexuais acessórias, as vesículas seminais, próstata,

glândulas bulbo-uretrais ou de Cowper, denominada de plasma seminal, que serve para a diluição, nutrição, transporte e proteção dos espermatozóides (MANN e LUTWAK-MANN, 1981; SETCHELL, 2014). O plasma seminal é uma mistura muito complexa de secreções dos testículos, sistema de dutos e glândulas acessórias que serve como veículo para os espermatozóides ejaculados.

Portanto, no plasma seminal é que estão os açúcares (frutose, ácido cítrico e sorbitol) e outras substâncias tais como proteínas, lípidos, minerais e vitaminas, que serão utilizados pela bainha mitocondrial da peça intermediária dos espermatozóides para sua combustão energética, resultando na movimentação das células espermáticas (VALE FILHO, 1997). As características seminais podem ser divididas em características físicas e morfológicas. As características físicas compreendem: volume, cor, aspecto, odor, pH, motilidade, vigor, turbilhonamento (movimento de massa) e concentração ou densidade espermática (VALE, 1994; CBRA, 2008). As características morfológicas são visualmente classificadas em anormalidades de cabeça e de cauda, podendo ainda serem agrupadas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais (BLOM, 1973; CBRA, VALE, 1994; CBRA, 2013).

Assim sendo, pode-se mensurar os níveis dos componentes bioquímicos do plasma seminal, tais como níveis de proteínas da membrana espermática específica e composição bioquímica do plasma seminal (AUSTIN e SHORT, 1990). Os componentes bioquímicos do plasma seminal do búfalo, açúcares redutores e proteínas e aminoácidos livres, são cruciais para a sobrevivência e a função dos espermatozóides, embora seus papéis exatos na fertilidade não sejam totalmente compreendidos. Nos últimos anos, mesmo sendo um exame auxiliar, a avaliação bioquímica do sêmen permite uma avaliação tanto de indivíduos como de rebanhos, indicando desequilíbrios metabólicos, nutricionais, patologias, alterações clínicas ou subclínicas. Assim, diferentes metabólitos têm sido utilizados como auxílio ao diagnóstico clínico (ANDRABI, 2009; SUKLA et al., 2009; VASCONCELOS, 2009; SANSONE, 2000; SHARMA et al., 2014; ALBUQUERQUE, 2016).

O papel do plasma seminal e suas proteínas na maturidade espermática têm sido amplamente estudados, apresentando resultados contrastantes nas diferentes espécies animais. Em humanos, touros e carneiros, o plasma seminal auxilia a motilidade espermática através do incremento da viabilidade e integridade de membrana das células (PICKETT et al., 1975; BAAS et al., 1983). Vasconcelos et al. (2009) demonstraram que o perfil proteico do plasma seminal de cavalos muda ao longo da maturação sexual e sugeriram que proteínas inibidoras de proteases presentes no plasma podem atuar como marcadores de qualidade seminal em

equinos. Por outro lado, em coelhos, estudos demonstraram que alterações na concentração do plasma seminal podem potencializar manutenção espermática, obtendo-se um incremento nos parâmetros de motilidade espermática a partir da adição de outros componentes ou aumento da diluição do sêmen (CASTELLINI et al., 2000).

Poucos artigos científicos têm relatado investigações sobre o efeito dos constituintes do plasma seminal, principalmente proteínas, sobre a fertilidade de búfalos. Por exemplo, Killian et al. (1993), utilizando a tecnologia de eletroforese em gel bidimensional, correlacionaram a fertilidade de touro com os níveis de quatro proteínas plasmáticas seminais, duas delas mais proeminentes em indivíduos com maior fertilidade e as outras duas mais abundantes nas de menor fertilidade.

A composição do açúcar do plasma seminal tem sido relacionada com a fertilidade, devido à sua importância, principalmente para a produção de energia dos espermatozoides (WILLIAMS e FORD, 2001). A frutose, que é o principal açúcar do plasma seminal, é originária das vesículas seminais e é essencial para o metabolismo espermático e motilidade (SETCHELL, 2014).

Em experimento de Battacharya (1968), no plasma seminal bubalino, obteve para frutose 355 mg /100 mL, cálcio 40 mg/ 100 mL, valores superiores ao presente estudo. Rawat et al. (1979), reportaram para frutose 538,7 mg/ 100mL, cálcio 43,4 mg/ 100mL, magnésio 5,2 mg/ 100mL, valores maiores que obtidos no presente estudo, porém para fósforo, valor foi menor, de 101,6 mg/100mL.

El-Azab et al. (1983) descreveu que a frutose é um componente influenciado pelas variações climáticas. Assim como, Ganguli (1990) em búfalos Murrah, relatou valores médios de frutose 684 mg/ 100mL, cálcio 44 mg/ 100mL e magnésio 4mg/ 100mL, também valores superiores ao respectivo experimento. Estes mesmos autores, ao comparar estações, obtiveram para frutose, no verão 742 mg/ 100mL, na estação chuvosa 864 mg/ 100 mL, no outono 803mg/100ml, no inverno 730 mg/ 100mL e na primavera 825 mg/ 100 mL. Os dados do presente estudo mostraram-se inferiores, mas deve-se levar em consideração a diferença climática (clima temperado em comparação ao clima tropical do experimento).

Vale (1994) obteve dados para frutose de 623 mg/100 mL, cálcio 44,4 mg/100 mL e magnésio 4,3 mg/100mL, valores maiores que obtidos no presente estudo, porém para fósforo, valor foi menor, de 108 mg/100 mL. Em experimento de Andrabi (2009), resultados no plasma seminal bubalino, para frutose foi de 368 mg/100 mL, variando até 815 mg/100

mL. Enfatizando que os trabalhos relatados foram realizados em clima diferente do presente experimento. Não há relatos em clima tropical amazônico. Assim, podemos pressupor que o clima tropical, diferentemente do clima temperado, influencia na qualidade do plasma seminal. Mesmo no período chuvoso, os dados de bioquímica seminal foram mais baixos que em experimentos em regiões temperadas.

A função dos aminoácidos semínicos livres de plasma não está totalmente estabelecida, embora se tenha demonstrado que atuam como combustíveis para os espermatozoides, criam condições favoráveis para a sobrevivência celular e estão provavelmente envolvidos em funções de desintoxicação (AL-HAKIM et al., 1974; IBRAHIM e BOLDIZSÁR, 1981). Eles são produzidos nos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias e também pela ação de enzimas proteolíticas endógenas em proteínas seminais após a ejaculação (ROUSSEL e STALLCUP, 1967). Não se observou relação direta entre os aminoácidos livres seminal e a fertilidade, com exceção do ácido glutâmico que, juntamente com o ácido aspártico, serina, alanina e glicina, constituem a maior porção de aminoácidos livres neste fluido (ROUSSEL e STALLCUP, 1967; SETCHELL, 2014).

A concentração de um determinado metabólito é indicador do volume de reservas de disponibilidade imediata. Essa concentração é mantida dentro de certos limites de variação fisiológica, considerados como valores de referência ou valores normais. Os animais que apresentam níveis fora dos valores de referência são animais que podem estar em desbalanço nutricional ou com alguma alteração orgânica que condiciona uma diminuição na capacidade de utilização ou biotransformação dos nutrientes, como já fora afirmado por Wittwer (1995) e Squires (2010). Com base nessas afirmações, no presente experimento, verificou-se que valores de componentes seminais como a frutose, albumina, cálcio e fósforo, apresentaram interferência nos valores normais, ou seja, sofreram decréscimo no período não-chuvoso. O que resultou em valores com diferenças estatísticas significativas nos dois períodos.

Pela análise dos resultados obtidos para os componentes do plasma seminal, tais como a frutose, proteínas totais, albumina, magnésio, cálcio e fósforo, apresentados na Tabela 7 e Gráfico 3, pode-se observar que frutose, albumina, cálcio e fósforo apresentaram diferença estatística entre ambos os períodos ($P < 0,01$).

Sansone et al. (2000) encontraram valores superiores para frutose, proteínas totais e cálcio que o presente experimento, porém, não apresentaram comparação entre períodos do ano, como relatado neste trabalho (chuvoso e não-chuvoso).

A principal fonte de energia para os espermatozoides é a frutose (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). A vantagem da frutose sobre a glicose parece ser pelo fato de que muitas bactérias, que competem com os espermatozoides pelo nutriente disponível, preferem a glicose a outras fontes de energia existentes no plasma seminal. Assim, para evitar que outras bactérias e células competitivas utilizem a fonte de energia dos espermatozoides, a frutose é utilizada como fonte de energia, uma vez que as bactérias preferem a glicose.

Outra razão é que a transformação metabólica do sorbitol em frutose é energeticamente, a maneira mais eficiente (sem ATP necessário) em comparação com a conversão glicolítica de glicose em frutose ($G \rightarrow G6P \rightarrow F6P \rightarrow F$). Por outro lado, o caminho do poliol é energeticamente preferido para metabolizar a frutose produzida durante a glicólise. Isto é apenas para mostrar a possível evolução da via do poliol uma vez que a vantagem da utilização da frutose como a fonte de energia foi estabelecida (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). Não existe ainda uma explicação plausível do porquê a frutose é a via mais vantajosa, de energia para os espermatozoides.

O açúcar redutor presente no plasma seminal de touros é a frutose, sendo o principal nutriente espermático em sêmen de mamíferos. A frutose seminal indica a capacidade de fertilização de touros (HAFEZ; HAFEZ, 2004; SQUIRES, 2010). Khawaskar et al. (2012), observaram valores para frutose diferentes entre o período chuvoso em comparação ao verão e inverno. Corroborando dados do presente experimento, que também observou-se valores superiores para frutose no período chuvoso.

Sabe-se que as proteínas plasmáticas seminais (PPS) constituem a maior parte dos componentes bioquímicos do PS, e que algumas são relativamente necessárias para a regulação da função do espermatozoides (STRZEZEK et al., 1992). Estas proteínas são derivadas originalmente do plasma e parcialmente sintetizadas e secretadas pelos testículos (KATO et al., 1985), epidídimo, (TURNER e REICH, 1987) e glândula vesicular (MANJUNATH, 1984). A composição proteica do plasma seminal nos mamíferos tem efeitos importantes sobre a função reprodutiva, em especial com a motilidade dos espermatozoides (Henricks et al., 1998), viabilidade (Brandon et al., 1999) e congelabilidade (ASAD-POUR et al. 2007).

No presente estudo foi encontrado níveis de proteína plasmática total PPS $1,6 \pm 0,5$ g/dL e $1,7 \pm 0,6$ g/dL, para o PCh e PnCh, respectivamente, sem diferença estatística significativa. Na literatura compulsada sobre o assunto, é escassa e não trata das concentrações de PPT em diferentes estações. Segundo Mann e Lutwak-Mann (1981) o

conteúdo de PPT varia de 3,5 a 5,0 g/100 mL no homem, enquanto Dixit et al. (2016) reportou valores de $7,86 \pm 0,34$ e $4,63 \pm 0,16$ g/dL para o bovino e búfalo, respectivamente, sem citar a estação do colheita dos ejaculados. Desta forma, os valores obtidos pelos referidos autores para búfalo, foi superior aos resultados encontrados neste trabalho, que foram de $1,6 \pm 0,5$ e $1,7 \pm 0,6$ g/dL no PCh e PnCh, respectivamente. Também no presente estudo não ocorreu diferença estatística entre os resultados nos dois períodos estudados. É importante salientar que a maioria dos trabalhos sobre PPT, estão direcionados para a determinação do peso molecular dessas proteínas, através de técnicas de biologia molecular, com os resultados expressos em kDa (SHARMA et al. 2014).

As proteínas desempenham um papel importante durante eventos fisiológicos de maturação de espermatozoides, ejaculação e maturação no trato genital feminino; portanto, seu papel no sêmen é vital (KHAWASKAR et al., 2012). Sharma et al. (2014) obtiveram maiores valores para proteínas totais que o presente estudo, porém, os autores evidenciaram diferença estatística significativa entre os períodos anuais, diferentemente do presente estudo, que não apresentou diferença entre os períodos ($P > 0,01$).

Sansone et al. (2000) reportaram níveis de proteínas totais, no plasma seminal de búfalos, de $2,86 \pm 0,14$ g/dL, valores maiores do que os encontrados no presente experimento. A concentração média total de PPT no plasma seminal de búfalos da raça Surti na Índia foi $2,54 \pm 0,51$ g/dL, sem nenhuma influência no decorrer das diferentes estações - verão, da monção à estação do inverno (KHAWASKAR et al., 2012). Segundo os mesmos autores, as proteínas plasmáticas seminais são muito semelhantes as proteínas do leite, sendo muitas delas glicoproteínas. Afirmam ainda que a interação proteína-sais minerais pode desempenhar um papel importante nos eventos fisiológicos, tais como, qualidade do sêmen, maturação de espermatozoides e capacitação no trato genital feminino.

A albumina compreende 60% das proteínas séricas totais e de 60 a 80% da pressão osmótica coloidal. A albumina sérica é sintetizada unicamente pelo fígado e tem várias funções fisiológicas tais como, transporte de substâncias de baixo peso molecular, como cálcio, hormônios e drogas, ligação de íons de metais pesados tóxicos, manutenção da pressão osmótica coloidal e provisão de uma reserva de proteína para o organismo. Normalmente, cerca de 4% da albumina corporal total é reabastecida diariamente, sendo que a taxa de produção depende do fornecimento de aminoácidos, da pressão oncótica no plasma, da concentração de citocinas inibitórias (especialmente IL-6) e do número de hepatócitos em

funcionamento. A semi-vida de circulação da albumina plasmática varia de 19 a 21 dias nas diferentes espécies domésticas (BACILA, 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo foram de $0,45 \pm 0,1$ e $0,3 \pm 0,1$ g/dL no PCh e PnCh, respectivamente. Na literatura compulsada, inexistem dados relativos as concentrações de albumina no plasma seminal de qualquer espécie doméstica, e mesmo em primatas. Assim, os resultados aqui apresentados, poderão servir para comparação em futuros estudos sobre esta importante proteína do organismo dos mamíferos.

A média de cálcio no presente estudo $20,6 \pm 2,2$ e $19,6 \pm 2,3$ mg/dL no PCh e PnCh, respectivamente, com diferença estatística significativa ($P < 0,005$), como consta na Tabela 7 e Gráfico 3. Estes resultados são inferiores aos reportados por outros autores Roy et al. (1960) $40,0 \pm 2,0$ mg/100 ml, Singh et al. (1970) $43,45 \pm 1,49$ mg/dL, Reddy e Raja (1979) $41,11$ mg/100 dL, e mais próximos aos relatados por Kanwal et al. (1998) $29,97 \pm 5,15$ mg/100 dL.

O teor mais elevado de cálcio no sêmen é relatado por alguns autores como tendo um efeito depressivo sobre o metabolismo dos espermatozóides, da mesma forma que os íons presentes no sêmen de bovinos ajudam a estimular a motilidade e a glicólise, ajudando a neutralizar o efeito depressivo do Ca presente no sêmen (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). Vale salientar que nos trabalhos acima compulsados, não houve citação da época da estação do ano em que os experimentos foram realizados, ao contrário dos resultados do presente estudo.

O fósforo é um elemento de vital importância para o crescimento, produção, reprodução e sanidade dos mamíferos, participando tanto da estrutura quanto das diversas funções bioquímicas e fisiológicas das células. Sua principal função no organismo é de formação da estrutura óssea na construção e manutenção do esqueleto animal dando suporte aos órgãos e músculos. Age sobre o equilíbrio ácido-básico dos fluidos através do sistema tampão fosfato. Atua como constituinte de fosfolipídeos estruturais nas membranas celulares tornando-se necessário para a absorção, movimentação, deposição e utilização das gorduras no organismo. Também é essencial para que ocorra a absorção de glicídios bem como para que ocorra o seu metabolismo, uma vez que é fonte de energia para processos metabólicos essenciais (contração muscular, condução de impulso neural, transporte epitelial) sendo armazenado em ligações de fosfato de alta energia na adenosina trifosfato (ATP) (BACILA, 2003).

Também participa do metabolismo de proteínas e de outros minerais. É um componente de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e de fosfoproteínas envolvidas na fosforilação

oxidativa das mitocôndrias. Além disso, faz parte do composto 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) reduzindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, facilitando a liberação de oxigênio aos tecidos. Ainda o P na forma de fosfato é uma importante função como tampão do trato genital de todos os mamíferos, bem como é fundamental no metabolismo intermediário de proteínas, lipídeos e carboidratos e na formação do glicogênio. Estimula enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase) e participa na fosforilação de várias fases intermediárias glicolíticas. Devido a todas as funções desempenhadas pelo P no organismo ele é essencial em todas as fases de produção dos animais, principalmente na reprodução (MANN e LUTWAK-MANN, 1981; BACILA, 2003).

A fração orgânica do plasma seminal do búfalo contém ésteres de fosfato, particularmente glicerilfosforilcolina (GPC), fosforilcolina e fosfato inorgânico. O GPC é encontrado em concentrações relativamente elevadas no plasma seminal dos machos, incluindo o búfalo. A GPC é sintetizada pelas células epiteliais do epidídimo, aparentemente sob controle androgênico. A baixa motilidade, progressão e movimentação dos espermatozoides nas diferentes espécies estão quase sempre associadas a baixas concentrações de GPC, independentemente da concentração de espermatozoides no ejaculado (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

Portanto do ponto de vista da fisiopatologia da reprodução, o P desempenha papel fundamental, sendo encontrado tanto na forma inorgânica (livre), associado na forma de fosfatos, fosfolípidos e participação nas reações enzimáticas, inclusive a fosforilação ou seja a conversão de glicose para frutose, o principal componente energético utilizado pelos espermatozoides na maioria das espécies (MANN e LUTWAK-MANN, 1981; BACILA, 2003).

No presente estudo, os níveis de P encontrados foram $11,6 \pm 4,6$ mg/dL e $7,8 \pm 4,5$ mg/dL, no PCh e PnCh, respectivamente. Esses resultados estão praticamente de acordo com os dados obtidos por Singh et al. (1969) que variaram de $9,82 \pm 0,96$ mg/dL no inverno, $9,67 \pm 0,97$ mg/dL no verão e o valor mínimo de $8,12 \pm 0,46$ mg/dL na primavera. Entretanto, são superiores quando comparados aos descritos por Banerjee e Gaguli (1973), para búfalo e bovino, $4,6 \pm 0,3$ mg/dL e $5,0 \pm 0,2$ mg/dL, respectivamente; bem como, os achados por Shukla et al. (2009) para búfalo que variou de $6,7 \pm 1,7$ a $7,0 \pm 1,3$ mg/dL, respectivamente. Os referidos autores trabalharam em duas regiões diferentes da Índia, entretanto não citam a estação do ano em que os trabalhos experimentais foram realizados. Os dados do presente

experimento também são superiores aos de Vale (1997), que reportou níveis de fósforo no plasma seminal de 5,4 mg/100mL.

No tocante ao magnésio, os valores encontrados no presente estudo foi de $2,6 \pm 0,5$ mg/dL e $2,7 \pm 0,7$ mg/dL, para o PCh e PnCh, respectivamente, sem diferença estatística ($P > 0,01$), conforme dados apresentados na Tabela 7 e no Gráfico 3. Sansone et al. (2000) reportaram níveis de magnésio $6,46 \pm 0,39$ mg/dL. Vale (1997) reportou níveis de magnésio de 4,3 mg/dL. Valores estes superiores ao presente experimento. O teor de magnésio, $6,61 \pm 0,49$ mg/dL, no plasma seminal de três touros da raça Murrah foi reportado por Shukla et al. (2009), como superior aos resultados de outros autores na Índia, ($5,24 \pm 0,49$ mg/dL, SINGH et al., 1970; 5,91 mg/dL, REDDY e RAJA, 1979), no entanto, teores de magnésio significativamente mais elevados (9,81 mg/dL) também foram relatados por Cragle et al. (1958). Alguns autores inferem que baixos níveis de magnésio estão associados com motilidade menor no sêmen de búfalos (SINGH, 1970; SHUKLA et al., 2009).

Na avaliação andrológica de um touro é importante o conhecimento dos parâmetros morfométricos, como os mensurados no presente estudo, que são circunferência escrotal (CE), perímetro torácico (PT) e peso corporal (P). A CE é uma das medidas biométricas mais utilizadas na avaliação de um reprodutor, podendo-se prever por esse parâmetro o potencial reprodutivo, bem como sobre a morfologia do testículo e da bolsa escrotal. É uma medida de fácil obtenção e alta repetibilidade, além de apresentar alta correlação com o P e PT, antevendo assim, a capacidade reprodutiva do animal e sua produção espermática (MELO, 1991; OHASHI, 1993; CHACUR, 1999, 2001; VALE et al., 2001; PANT et al., 2003; BRITO et al., 2004; AHMAD et al., 2010; OHASHI et al., 2011).

Em bubalinos, dados sobre a biometria testicular são escassos e com grande variação na literatura existente, tendo em vista a diferença racial, mestiçagem e de manejo nutricional, dificultando, assim, a obtenção de uma padronização do tamanho testicular para a referida espécie. (OHASHI et al., 2011). Na literatura consultada, não há dados comparando esses parâmetros nos períodos chuvoso e não-chuvoso, conforme os apresentados no presente experimento.

Os dados obtidos no presente estudo para CE foram de $28,32 \pm 2,3$ cm e $28,28 \pm 1,8$ cm, no PCh e no PnCh, respectivamente, sem diferença significativa entre os períodos ($P > 0,01$). Os dados médios de CE do experimento, apesar de não terem diferido estatisticamente entre períodos, estão de acordo com os padrões de normalidade descritos por

Ohashi (1993); Vale et al. (2001); Vale et al. (2004); Ohashi (2011); e são superiores aos de Crudelli et al. (2001) e Pant et al. (2003).

Para o PT os resultados foram de $189,09 \pm 14,28$ cm e de $187,06 \pm 11,05$ cm, PCh e PnCh, respectivamente, também sem diferença estatística significativa ($P > 0,01$). Da mesma forma que os dados médios para o P, que foram de $477,46 \pm 112,6$ Kg e $473,45 \pm 84,48$ Kg ($P > 0,01$), PCh e PnCh, respectivamente, como apresentados no Gráfico 4 e na Tabela 8. Os valores médios de PT e P são similares aos dados de Souza Júnior et al. (2008). E corroboram os dados para peso de Ohashi (1993); Vale et al. (2001); Vale et al. (2004) e Ohashi et al. (2011). É importante salientar que o presente experimento utilizou animais jovens, com média de 2,5 anos de idade, em fase de crescimento, em que o crescimento testicular e ganho de peso é gradual e lento. Isso explicaria o fato de não ter havido diferença estatística significativa entre os períodos.

Os efeitos do estresse térmico no bem-estar dos animais têm sido largamente discutidos do ponto de vista zootécnico e econômico, pois o calor é um dos principais fatores restritivos para o sucesso da produção animal nos trópicos e, ocorrendo mudanças drásticas nas funções biológicas, pelo estresse térmico, levando a prejuízos no desenvolvimento ponderal do animal acometido, interferindo na produção de carne e leite, reprodução e capacidade de trabalho, além de prejudicar no apetite, ingestão, eficiência alimentar (MARAI e HABEEB, 1998; AHMED et al., 2016). Ao mesmo tempo, em que ocorre aumento da temperatura corporal, instala-se um aumento de variáveis fisiológicas, como a sudação e a frequência respiratória, redução das perdas de água nas fezes e na urina, disfunções no metabolismo protéico, energético e hidro-mineral, assim como distúrbios em reações enzimáticas e secreção de hormônios. Diferentemente do reportado, na literatura compulsada, no presente experimento, os animais não apresentaram aumento na FR e TR, no decorrer do PnCh. Os dados para FR foram de $22 \pm 6,8$ mpm de $23 \pm 6,7$ mpm, no PCh e PnCh, respectivamente. Os dados de TR, foram de $38,3 \pm 0,8^\circ\text{C}$ e $38,2 \pm 0,8^\circ\text{C}$, no PCh e PnCh, respectivamente. Assim, os dados de FR e TR não apresentaram diferença estatística entre os períodos ($P > 0,01$).

Assim, por os búfalos apresentarem uma versátil adaptação e aclimatação aos trópicos, utilizam a respiração, com alta habilidade fisiológica para eliminar o excesso de calor (VILLARES, RAMOS e ROCHA, 1979; SOUZA JÚNIOR et al., 2008) podendo-se portanto, imputar que o parâmetro FR contribuiu de forma direta para não haver diferença estatística

significativa entre os dados obtidos para esse parâmetro no PCh e no PnCh, do presente experimento.

Os búfalos são animais homeotérmicos e, como tal, são capazes de manter a sua temperatura corpórea dentro de uma ampla faixa, valendo-se para isso de alguns artifícios fisiológicos e comportamentais que auxiliam na termorregulação (RIBEIRO, 2002), fato esse que pode explicar a temperatura retal manter-se constante ao longo do experimento.

Matos (2008), reportou que existem outros mecanismos fisiológicos que favorecem a termorregulação, como a elevação da temperatura da pele, para que haja evaporação cutânea do calor; conforme foi observado no presente experimento. O bubalino é mais sensível que o bovino à radiação solar direta e ambientes com altas temperaturas (SOUZA JÚNIOR et al., 2008). O que pode-se observar pelo dados de temperatura superficial (TS), que apresentaram diferença estatística ($P < 0,01$), entre o PCh e PnCh. Para dados de TS, na região de cabeça foram $33,3 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ no PCh e $36,2 \pm 2,4^{\circ}\text{C}$ no PnCh; na região do dorso $33,6 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ no PCh e $35,1 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ no PnCh; na virilha $32,3 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ no PCh e $34,6 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ no PnCh e bolsa escrotal $30,3 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ no PCh e $32,3 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ no PnCh, conforme dados representados no Gráfico 5 e Tabela 9.

Da mesma forma, os dados de FC, TS (cabeça, dorso, virilha e bolsa escrotal) diferiram estatisticamente entre os períodos experimentais ($P < 0,01$). Assim, podemos inferir que, se esses mecanismos adaptativos não funcionarem normalmente, ou se não houverem condições para melhoria do manejo dos animais, tais como formas de aliviar os fatores estressantes (banhos, sombra, etc), ocorrerá elevação da temperatura retal, indicando que os mecanismos de liberação de calor tornaram-se insuficientes para manter a homeotermia, aspecto esse observado no presente estudo, em que não houve aumento da temperatura corpórea no PCh e no PnCh.

Os bubalinos são mais sensíveis em temperaturas acima de $36,1^{\circ}\text{C}$ e à exposição direta ao sol, ocasionando rápidas alterações fisiológicas acentuadas, que dificultam a adaptabilidade ao meio ambiente. Assim, em condições adversas, ao se instalar o estresse térmico, ocorre um aumento da TR, FC e FR, deprimindo a atividade metabólica e a atividade da glândula tireóide, com conseqüente redução da ingestão de alimentos e do nível de produção, com distúrbios diretos sobre o desempenho produtivo (RIBEIRO e VALE, 2005; SOUZA JÚNIOR et al., 2008; AHMED et al., 2016). No presente experimento, houve um aumento de FC e TS (cabeça, dorso, virilha e testículos) no PnCh ($P < 0,01$). Os dados de FC

no período chuvoso foram de $54 \pm 10,9$ bpm; no período não-chuvoso foram $48 \pm 11,8$ bpm, com diferença estatística entre os períodos ($P < 0,01$).

Portanto, mesmo com esses problemas causados pelos extremos impostos pelo estresse térmico nas regiões tropicais, o búfalo se adapta bem aos climas quentes e úmidos dos trópicos e subtropicais. Esta adaptabilidade é atribuída à natureza semi-aquática, procurando água e mantendo o corpo submerso a fim de reduzir o efeito do calor, como muito observado no ambiente de várzea. Assim, alterações na temperatura retal, na frequência cardíaca e na frequência respiratória têm sido os dois parâmetros mais utilizados como medida de conforto animal e adaptabilidade a ambientes adversos, ou como medida da eficácia de modificações ambientais (HEMSWORTH et al., 1995; SOUZA JÚNIOR et al., 2008; AHMED et al., 2016). Por isso, os parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e temperatura superficial foram analisados no presente experimento. Os dados do experimento estão de acordo com os de Souza Júnior et al.(2008).

Portanto, é importante salientar que a presente pesquisa é o primeiro estudo a nível regional sobre o assunto pertinente.

7. CONCLUSÃO

Na mesorregião do Baixo Amazonas, os ejaculados bubalinos são de melhor qualidade nos meses do período chuvoso, mostrando melhor eficiência reprodutiva nesse período. Não se recomenda o período não-chuvoso para reprodução.

A hipótese desse trabalho foi validada visto que os parâmetros reprodutivos bubalinos, como turbilhonamento, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e integridade de membrana plasmática, foram melhores no período chuvoso que no não-chuvoso, apresentando diferença significativamente entre os períodos.

Para avaliação da morfologia espermática, a técnica de gota úmida com uso de microscopia de contraste de fase foi mais precisa que a técnica de coloração por eosina-nigrosina.

Os parâmetros bioquímicos do sêmen para frutose, cálcio e fósforo foram os que diferiram estatisticamente nas estações chuvosa e não-chuvosa, apresentando melhores resultados no período chuvoso.

Os parâmetros fisiológicos que sofreram influência do período não-chuvoso, em comparação ao chuvoso foram frequência cardíaca e temperatura superficial, de cabeça, dorso, virilha e bolsa escrotal.

Os dados morfométricos de circunferência escrotal, perímetro torácico e peso não variaram durante os períodos estudados.

Com base dos resultados discutidos, nas regiões onde ocorre a predominância de temperatura tropical, como na Região Amazônica, com clima tropical úmido, mesmo com uma manejo especial (acesso banhos diários e sombra), no período não-chuvoso ocorre declínio na qualidade dos ejaculados.

8. REFERÊNCIAS

- AANESEN, A., FRIED, G., ANDERSSON, E. Carrier mediated GABA uptake in human spermatozoa indicating the presence of a high affinity g-aminobutyric acid transport protein. **Biology Reproduction**, 54, 841–846. 1996.
- ABLAS, D. S.; TITTO, E. A. L.; PEREIRA, A. M. F. et al. Comportamento de bubalinos a pasto frente a disponibilidade de sombra e água para imersão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 167-175, 2007.
- AHMAD, M.; LATIF, M.; QAZI, M. H.; SAHIR, N.; ARSLAN, M. Age-related changes in body weight, scrotal size and plasma testosterone levels in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.22, p.651-656, 1984.
- AHMAD, N.; UMAIR, S.; SHAHAB, M.; ARSLAN, M. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Nili-Ravi buffalo bulls. **Theriogenology**, v.73, p.20-25, 2010.
- AHMED, H.; ANDRABI, S. M. H.; JAHAN, S. Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. **Theriogenology**, v.86, p. 1516-1522. 2016.
- ALBUQUERQUE, R. S. **Comparação entre dois métodos de remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2016. Jaboticabal, 68 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- AL-HAKIM, M.K.; GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.L. Free amino acids and amino compounds in bovine seminal plasma. **Journal of Dairy Science**, v.53, p.84-88, 1970.
- ALMEIDA, J. C. F.; SILVA, G. P.; SILVA, J. A. R. Influência climática nos mecanismos fisiológicos e comportamentais de bubalinos na região amazônica. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 42 e Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA, 1, 2015, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ANCLIVEPA, 2015. p.726-730.
- ANDRABI, S. M. H. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, 44, p.552-69. 2009.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; GARCIA, A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 1, 2004, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2004. v.1, p. 166-179.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, LWO; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, AFC.; RAPHAEL, CF.; GARCIA, AR. 2005. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.145-150, 2005.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; PERES, K. R. Biotécnicas Aplicadas a la Evaluación de Sêmen Criopreservado Bovino. In: **Seminário Internacional de Reproducción en Grandes Animales**, 5, Bogotá, Colômbia. Bogota: [s.n.], 2006.

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

ASAD-POUR, R.; SHOUSHARI, S.; REZAI, S.; ANSARI, M. SDS-PAGE of buffalo bull seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Animal Reproduction Science*, 102, 308–313, 2007.

ASAD-POUR, R. Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(2), 1027-1034, 2012.

AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals - Germ Cells and Fertilization**. New York: Cambridge University Press, 1990. 285p.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Robe Editorial, 2003. 583p.

BANERJEE, A. K.; GANGULI, N. C. Some aspects of the composition of Buffalo semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33, p. 171-173, 1973.

BARBOSA, O.R.; ZEOULA, L.M.; SIRENA, R.M.; et al. Comparação nas respostas termoregulatórias de búfalos e bovinos em confinamento. 1. Temperatura da Superfície do Corpo e Taxa de Sudação. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA/PASTAGENS, 44., 2007, Jaboticabal - SP. **Anais...UNESP**, 2007. CD.

BARNABE, V. H.; BARUSELLI, P.; BARNABE, R. C.; SILVA, E. O. T. R.; VISINTIN, J. A. Artificial insemination of buffaloes using two different diluents. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, IV, v. 3, 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994, p.547-548.

BARNABE, V. H. Colheita e avaliação o sêmen de búfalos. In: Simpósio Paulista de Bubalinocultura, 1, Jaboticabal, Brasil. **Anais...** Jaboticabal: Funep. pp. 122-125. 1999.

BARROS, P. M. H.; NICHI, M.; CORTADA, C. N. M.; CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Semen evaluation of Murrah buffalo bulls using sperm functional tests. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 8, v.6, 2007, Caserta-Itália. **Proceedings...** Caserta, 2007, p.772-774.

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.68, p.275-280, 1983.

- BHATTACHARYA, P. Buffaloes. In: E.J. Perry (Ed.) **The Artificial Insemination of Farm Animals**. 4th ed. Rutgers University Press, NJ; 1968, p.159-195.
- BATTACHARYA, P. Reproduction. In: Cockrill R. The husbandry and health of the domestic buffalo. Rome: **FAO**, 1974. p.105-166.
- BHAKAT, M.; MOHANTY, T. K.; GUPTA, A. K.; PRASAD, S.; CHAKRAVARTY, A. K.; KHAN, H. M. Effect of season on semen quality parameters in Murrah buffalo bulls. **Buffalo Bulletin**, v. 34, n.1, 100-112. 2015.
- BHOSREKAR, M.R.; PUROHIT, J.R.; GOKHALE, S.B. Semen characteristics and behavioral patterns of buffalo bulls in relation to age and seasons. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v.62, n.3, p.251-255, 1992.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification on the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, n.7-8, p.383-391, 1973.
- BONGSO, T. A.; HASSAN, M. D.; NORDIN, W. Relationship of scrotal circumference and testicular volume to age and body weight in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.22, p.127-134, 1984.
- BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, 52, 863–873, 1999.
- BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A.; KASTELIC, J. P. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.58, p.1175-86, 2002.
- BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; UNANIAN, M. M.; DODE, M. A.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.62, p.1198-217, 2004.
- CARTER, A. P.; WOOD, P. D. P.; WRIGHT, P. A. Association between scrotal circumference, live weight and sperm output in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.59, p.447-451, 1980.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; MORONI, M.; MINELLI, A. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. **Animal and Reproduction Science**, v.63, p.275-282, 2000.
- CASTRO, S. R. S. **Uso de antioxidantes para elevação do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. Belém, 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2010.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovinos sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. São Paulo, 2005.186 p. Tese (Doutorado em Medicina

Veterinária) – Departamento de Reprodução Animal. Universidade Federal de São Paulo. 2005.

CHACUR, M. G. M. **Estresse térmico em touros bufalinos *Bubalus bubalis*, avaliações das características fisiológicas da reprodução.** 1999. 126f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 1999.

CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Effect of heat-stress on spermatogenesis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: **Proceedings...** World Buffalo Congress, 6, 2001, Maracaibo, Venezuela. Maracaibo:[s.n.]. pp. 289-294. 2001.

CHENOWETH, P. J. **Breeding soundness evaluation in bulls.** In: Morrow DA (Ed.). *Current therapy in theriogenology*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1981. p.330-339.

CHINNAIYA, G.P.; GANGULI, N.C. Effect of age and season on the initial attributes and preservability of buffalo bull semen. In: Acharya, R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, S. _Eds..., **Recent Advances in Buffalo Research** (3) pp. 80–86. 1990.

COCKRILL, W. R. The Working Buffalo. In: W. R. Cockrill, **The Husbandry and Health of the Domestic Buffalo.** Rome: FAO, 1974, p. 313-328.

COCKRILL, W. R. **Buffalo production in Brazil – report of a visit.** FAO, 1986, p.7

COIMBRA, A. S. **Características seminais de touros bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*), taurinos (*Bos taurus taurus*) e bufalinos (*Bubalus bubalis*), doadores de sêmen em condições de trópico úmido amazônico.** Belém, Pará [em português]. Belém, Brasil: Universidade Federal do Pará. Dissertação de Mestrado. 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. P. 104.

COULTER, G. H.; LARSON, L. L.; FOOTE, R. H. Effect of age on testicular growth and consistency of holstein and angus bulls. **Journal of Animal Science**, v.41, p.1383-1389, 1975.

COULTER, G. H. Escrotal circumference: a review. In: Annual Meeting of The Society for Theriogenology, 1991, San Diego, CA. **Proceedings...** San Diego: Society for Theriogenology, 1991. p.113-116.

CRAGLE, R. G.; SALISBURY, G. W.; ANUROI, I. M. Distribution of bulk and trace minerals in bull reproductive tract fluid and semen. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p.1273-1277, 1958.

CROMWELL, G.L. **Handbook of copper compounds and applications**, pp. 177 – 202, 1997.

CRUDELLI, G. A.; MALDONADO, V. P.; BARBARAN, S. M. F.; JIMÉNEZ, G. T.; PELLERANO, G. Evaluación de machos bufalinos na Argentine. In: **World Buffalo Congress**, 6, 2001, Maracaibo, Venezuela. Maracaibo: WBC, 2001. v.2, p118-122.

DERAGON, L. A. G.; LEDIC, I. L. Avaliação da circunferência escrotal em touros Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, p.227-233, 1990.

DIXIT, S.; PANDEY, V.; SWAIN, D. K.; NIGAM, R.; SHARMA, A.; SHARMA, D.; SAXENA, A.; SINGH, P. Seminal plasma and sperm membrane proteins of buffalo and cattle bulls: a comparative study. **Buffalo Bulletin**, v. 35, n.3, 2016.

DODE, M. A. N.; SCHENK, J. A. P.; SILVA, A. E. D. F. Determinação da puberdade em machos Nelore e mestiços. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl, n.1, p.185, 1989. Resumo.

EGHBALI, M.; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAEI, S.; ANSARI, M. H. K. Calcium, magnesium and total antioxidant capacity (TAC) in seminal plasma of Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*) bulls and their relationships with semen characteristics. **Veterinary Research Forum**, 1(1), 12-20, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Boas práticas agropecuárias – bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 82p.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia brasileira: História, índices e conseqüências. *Megadiversidade*, v. 1, n. 4, p. 113-123, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **FAOSTAT: Agriculture**, 2014a. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections>>. Acesso: 3 de março de 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **FAOSTAT: Live animals - Bufaloes**, 2014b. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections>>. Acesso: 3 de março de 2017.

FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, 118, 176-81. 2010.

FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.160-170, abr./jun. 2011. Disponível em www.cbra.org.br

GALLI, A.; BORNAGHI, V.; BALDUZZI, D.; BUTTAZZONI, L.; ALEANDRI, R. Sexual behaviour and semen quality relating to italian buffalo. World Buffalo Congress, 3, Varna, Bulgaria. **Proceedings...** Varna: World Buffalo Congress, 1, pp. 562–570. 1993.

GANGULI, N. C. Problems of long term semen preservation. In: World Buffalo Congress, 2, New Delhi, India, December 1988. Volume II, Part II. Invited papers and special lectures. **Proceedings...** Indian Council of Agricultural Research, 1990. p. 244-253.

GANGWAR, P. C. Climate and reproduction in buffaloes – a review. **The Indian Journal of Dairy Science**, 33:419-426. 1980.

GARCIA, A. R., GONÇALVES, K. S., NAHÚM, B. S., MATOS, L. B., BARBOSA, D. L. M., SIMÕES, A. R., MONTEIRO, P. J. C. Eficiência da detecção de estros em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia. In: CONGRESSO ESTADUAL DE

MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 2006, Gramado. **Anais...** Gramado: SOVERGS, 2006. p.3051-3056.

GARCIA, A.R. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.121-130, 2013.

GUIMARÃES, J. D.; FRENEAU, G. E.; VALE FILHO, V. R.; FONSECA, V. O. Peso corporal, desenvolvimento testicular e libido, em touros pré-puberes da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl, n.1, p.197, 1989. Resumo.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos - Ginecologia**. Varela, São Paulo, 2005, 551 p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HANSEN, Peter J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.

HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; BEVERIDGE, L.; et al. The welfare of extensively managed dairy cattle: a review. **Applied Animal Behaviour Science**, v.42, p.161-182, 1995.

HENRICKS, D. M.; KOUBA, A. J.; LACKEY, B. R.; BOONE, W. R.; GRAY, S. L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, 59, 330–337, 1998.

HUSNA, A. U.; EJAZ, R.; QADEER, S.; AZAM, A.; RAKHA, B. A.; ANSARI, M. S.; SHAHZAD, Q.; JAVED, M.; VAZQUEZ-LEVIN, M. H.; AKHTER, S. A comparative analysis of sperm selection procedures prior to cryopreservation for Nili-Ravi buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen-: Assessment of its impact on post-thaw sperm functional quality. **Anim Reproduction Science**, 174:29-36, 2016.

IBRAHIM, M.A.R.; BOLDIZSÁR, H. Studies on free amino acid content in seminal plasma of I. A. bulls of diferent performance. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.29, p. 263-269, 1981.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Mapa Integrado dos Zoneamentos Ecológico-Econômicos dos Estados da Amazônia Legal**. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário 2012**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013, 777p.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e Bubalinos. In: Hafez, ESE, Hafez, B. **Reprodução Animal**. Barueri, Brasil: Manole. pp. 159-171. 2004.

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

JÖCHLE, W.; LAMOND, D. R. **Control of reproductive functions in domestic animals**. Martinus Nijhoff., 1980. 248p.

- KALUDIN, I.; DIMITROVA, I. Dependence between the magnesium and calcium content of the spermatozoa of ram and their motility. **Veterinarno-Meditsinski Nauki**, v. 23, n. 2, p.29-33, 1986
- KANWAL, M. R.; REHMAN, R. U.; AHMED, A.; SAMAD, H. A. Comparative studies on biochemical constituents of the buffalo and crossbred bull semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, 21, 46, 1998.
- KARAGIANNIDIS, A. The distribution of calcium in bovine spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 46, n. 1, p. 83-90, 1976.
- KATO, M.; SUNG, W. K.; KATO, K.; GOODMAN, D. S. Immunohistochemical study on the localization of cellular retinol binding protein in rat testis and epididymis. **Biology of Reproduction**, 32, 172-189, 1985.
- KER, P. G. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento da raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a detecção da ovulação**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 81p. 2010.
- KHAWASKAR, M. V.; PANCHAL, M. T.; DHAMI, A. J.; PATEL, J. A. Seasonal variation in physico-morphological and functional characteristics of semen of Surti buffalo bulls and their interrelationships. **Indian Journal of Field Veterinarians**, v. 8, n.2. 2012.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- KOONJAENAK, S.; CHANATINART, V.; EKWALL, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphological features of spermatozoa of swamp buffalo AI bulls in Thailand. **Journal of Veterinary Medicine**, v.54, p.169-178, 2007.
- KUMAR, S.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Effect of yolk, glycerol and sugars on post-thaw survival of buffalo spermatozoa in TRIS dilutor. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v.64, n.4, p.362.364, 1994.
- KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; JAN, M. H.; SWAMI, D. S.; SHARMA, R. K. Quantification of leptin in seminal plasma of buffalo bulls and its correlation with antioxidant status, conventional and computer-assisted sperm analysis (CASA) semen variables. **Animal Reproduction Science**, 166, 122-127. 2016.
- LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Produção animal no bioma amazônico: atualidades e perspectivas. **Anais...** João Pessoa: Simpósio da 43ª Reunião Anual da SBZ, 2006. p.42-60.
- LOURENÇO JÚNIOR, J.B; GARCIA, A.R. Panorama da bubalinocultura na Amazônia. In: Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia,1., 2008, P.1-45 Belém, PA. Meio ambiente e pecuária. **Anais...** Belém, PA: FAEPA; Instituto Frutal; SEBRAE-PA, 2008.
- MACHAL, L.; CHLADEK, G.; STRAKOVA, E. Copper, phosphorus and calcium in bovine blood and seminal plasma in relation to semen quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, 11(3), 425-435, 2002.

MANJUNATH, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in Bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. **World Scientific**, Singapore, pp. 49–61, 1984.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology**, Biochemistry and Investigative Andrology. Springer, 1981.

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

MARZEC-WRÓBLEWSKA, U.; KAMIŃSKI, P.; LAKOTA, P. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. **Folia Biologica** (Praha), 58, 7-15, 2012.

MATOS, L.B. **Conforto térmico e eficiência da inseminação artificial em tempo fixo em búfalas leiteiras mantidas em sistemas silvipastoris na Amazônia Oriental**. 2008. Belém, 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará.

MCCOOL, C. J.; ENTWISTLE, K. W.; GILHAM, M. P. Testis growth rates in the Australian Swamp buffalo. **Buffalo Journal**, v.1, p.29-36, 1985.

MELO, M. I. V. **Desenvolvimento testicular e dinâmica da espermatogênese de búfalos mestiços de 10 a 24 meses de idade**. 1991. 66f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 1991.

MENEGASSI, S. R. O. **Aspectos bioeconômicos da avaliação andrológica em touros de corte. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2010. 125p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Agronomia, 2010.

MOHAN, G.; SAHNI, K.L. Efficiency of semen production in buffalo bulls. In: Acharya, R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, S. Eds., **Recent Advances in Buffalo Research** (3) pp. 14–16. 1990.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. 2003. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. 137p.

NEVES, K. A. L.; XIMENES, T.; MARTINEZ, G. B.; MORINI, A. C.; MINERVINO, A. H. H.; VALE, W. G. A pecuária na Amazônia: a busca por um modelo sustentável. **Papers do NAEA**, n. 330, p. 3-19, 2014. 2014.

OBA, E.; AMSTALDEN, M.; SANTOS, J. E. P.; BONFIM, S. R. M.; EMÍLIO, S. Seasonal variations of chemical attributes in buffalo semen. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** São Paulo:ABCB. pp. 576-578.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Aspecto reprodutivo do macho bubalino. In: Vale, WG. (Coord.). **Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução**. Campinas, Brasil: Fundação Cargill. pp. 69-86. 1988.

OHASHI, O. M. **Estudo morfológico do testículo de búfalos mestiços (Bubalus bubalis) em diferentes idades**. 1993. 111f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 1993.

- OHASHI, O. M. Inseminação Artificial em Bubalinos. In: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.103-123.
- OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; SOUSA, J. S.; SOUSA, A. J. O.; CORDEIRO, M. S.; BIONDI, F. C. Produção *in vitro* de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, 2003.
- OHASHI, O. M.; BARUSELLI, P. S. **Biotécnicas da reprodução animal aplicadas em bubalinos**. In: Biotécnica aplicadas à Reprodução Animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.105-123.
- OHASHI, O. M.; SANTOS, S. S. D.; MIRANDA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; COSTA, N. N.; SILVA, T. V. G. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 35 (2):88-94. 2011.
- PAIXÃO, R. L. É possível garantir bem-estar aos animais de criação? **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.11, n.36, p.66-73, 2005.
- PANGAWKAR, G.R.; SHARMA, R.D.; BISWAS, R.K.; DUGWEKAR, Y.G. Electrolyte composition of seminal plasma in relation to freezability in HolsteinFriesian bulls. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 4, p. 497-9, 1988.
- PANT, H. C.; SHARMA, R. K.; PATEL, S. H.; SHUKLA, H. R.; MITTAL, A. K.; KASIRAJ, R.; MISRA, A. K.; PRABHAKAR, J. H. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. **Theriogenology**, v.60, p.27-34, 2003.
- PHOGAT, J. B.; PANDEY, A. K.; SINGH, I. Seasonality in buffaloes reproduction. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, 6(2): 46-54. 2016.
- PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J. J.; BYERS, W. W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.26, p.167-174, 1975.
- PIEIDADE, M. T.; SCHOENGAR, J.; JUNK, W. J. O manejo sustentável das áreas alagáveis da Amazônia central e as comunidades de herbáceas aquática. **Revista Uakari**, v. 1, n. 1, p. 29 - 38, 2005.
- PRINCEWILL, O. I.; UCHENNA, A. E.; CHARLES, O. I.; UWAEZUOKE, I. M. Interactions between Dietary Minerals and Reproduction in farm Animal. **Global Journal of Animal Scientific Research**, 3(2), 524-535, 2015.
- PROSSER C. L., HEATH J. E. Temperature. In: **Comparative animal physiology, environmental and metabolic animal physiology** (ed. Prosser C. L., editor.), 1991, p. 109-166, 4th, New York, NY: John Wiley & Sons, 1991.
- PUBLICOVER, S.; HARPER, C.V.; BARRATT, C. Ca²⁺ signalling in sperm making the most of what you've got. **Nature Cell Biology**, 9, 235-242, 2007.

- QUIRINO, C. R. Observation on testicular size and sexual behavior in crossbred buffaloes. In: Buffalo Symposium of Americas, 1, 2002, Belém, PA. **Proceedings...** Belém: BSA, 2002. p.460-462.
- RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S.; AHMAD, N. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.31-41, 2000.
- RAWAT, J. S. Physico-chemical factors in buffalo spermatozoal activity [in India]. **FAO Animal Production and Health Papers (FAO)**, 1979.
- REDDY, N. M.; RAJA, C. K. S. V. Seasonal variation in fructose, citric acid and ascorbic acid contents of buffalo semen. **Indian Veterinary Journal**, 56: 660-662, 1979.
- RIBEIRO, H. F. L.; LÁU, H. D.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Preliminary report on artificial insemination in buffaloes of the Amazon region, through imported semen. In: CONGRESSO MUNDIAL DOS CRIADORES DE BÚFALOS, 4, v.3, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.591-593.
- RIBEIRO, H. F. L. Característica do manejo reprodutivo em búfalos na Amazônia. In: Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, 1, 2002, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s.n.]. pp.101-104. 2002.
- RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Características reprodutivas de bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana pós-parto.. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n.2, p. 63-73, 2005.
- ROUSSEL, J. D.; STALLCUP, O. T. Some amino acids aspects of bovine semen. **Fertility and Sterility**, v.18, p.331-341, 1967.
- ROY, A.; PANDEY, M. D.; RAWAT, J. S. Composition of bovine semen. **Indian Journal of Dairy Science**, 13: 112, 1960.
- SAEED, A.; CHAUDHRY, R.A.; KHAN, I.H.; KHAN, N.U. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups ,in: R.M. Acharya, R.R. Lokeshwar, S. Kumar (Eds.), **Recent Advances in Buffalo Research**, vol. 3, pp. 17–19. 1990.
- SANSONE, G.; NASTRI, M. J. F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, 62 (1): 55-76. 2000.
- SEMCZUK, M.; KURPISZ, M. **Andrologia** (In Polish). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2006, 494p.
- SETCHELL, B. P. Semen and its constituents. In: Chenoweth, P. J.; Lorton, S. P. ed. **Animal andrology: theories and applications**: Cabi. London, UK, 2014. 584p.
- SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, ano 28, n.167, p.36-39, 2009.
- SHAFIE, M.M. Physiological responses and adaptation of water buffalo. In: M.K. Yousef, ed. **Stress physiology in livestock**, vol. 2: Ungulates. Florida, USA, CRC. 1985.

SHAHZAD, Q.; MEHMOOD, M. U.; KHAN, H.; HUSNA, A. U.; QADEER, S.; AZAM, A.; NASEER, Z.; AHMAD, E.; SAFDAR, M.; AHMAD, M. Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. **Animal Reproduction Science**, 167: 83-88. 2016.

SHEIKH, P. A.; MERRY, F. D.; MCGRATH, D. G. Water buffalo and cattle ranching in the Lower Amazon Basin: Comparisons and conflicts. **Agricultural Systems**, v.87, p. 313–330, 2006.

SILVA, J. A. R.; ARAÚJO, A. A.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Conforto térmico de búfalas em sistema silvipatoril na Amazônia Oriental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.10 p.1364-1371, 2011.

SINGH, L. N.; SENGUPTA, B. P.; RAWAT, J. S. Studies on certain chemical constituents of buffalo semen. **Indian Journal of Animal Science**, 40, 1, p.1-8, 1970.

SHARMA, L.; PANDEY, V.; NIGAM, R.; SINGH, P.; SAXENA, A.; SWAIN, D. K. Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.3, 387-391, 2014.

SHUKLA, M. K.; MISRA, A. K.; GUPTA, H. P. Studies on some biochemical constituents of murrh buffalo (*bubalus bubalis*) seminal plasma. **Buffalo Bulletin**, v.28, n.3, 2009.

SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology**. Walingford: CABI Publishing. 272 p. 2003.

SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology**. 2nd edition. Walingford: CABI Publishing. 281 p. 2010.

SOUZA JÚNIOR, J. B. F.; DOMINGOS, H. G. T.; SILVA, R. B.; LIMA, R. N. Termorregulação em búfalos manejados em ambiente tropical. **PUBVET**, Londrina, V. 2, N. 41, Art. 396, 2008.

SOUZA, I. M. P.; COSTA, A. C. L.; SILVA JUNIOR, J. A.; FEITOSA, J. R. P. Estudo do conforto térmico em cidades de diferentes dimensões no estado do Pará. In: Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 17, 2011, Guarapari, ES. **Actas...** Guarapari: SESC (1):1-5. 2011.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, 29, 35–52, 1992.

TASH, J. S.; MEANS, A. R. Cyclic adenosine 3,5 monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 75-104, 1983.

TITTO, E. A. L.; RUSSO, H. G.; LIMA, C. G. Efeito do banho de água sobre o conforto térmico de bubalinos. In: Congresso de Zootecnia, 6, 1997, Lisboa. **Anais...** Lisboa: APEZ, 1997. v.1, p.15-18. 1997.

TURNER, T. T.; REICH, G. W. Influence of protein in rat cauda epididymal lumen fluid on cauda sperm motility. **Gamete Research**, 18, 267–278, 1987.

VALE, W. G.; SOUSA, J. S.; OHASHI, O. M.; RIBEIRO, F. H. L. Biometria do sistema genital de búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, p.66-74, 1981.

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

VALE, W. G.; GASTAL, D. W.; SNEL-OLIVEIRA, M. V.; MONDADORI, R. G. Relationship of age, bodyweight and scrotal circumference in Murrah buffalo bulls. In: World Buffalo Congress, 6, 2001, Maracaibo, Venezuela. **Proceedings...** Maracaibo: WBC, 2001. v.2, p.256-262.

VALE, W. G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. **Anais...** Belém: PRODEPA - Governo do Estado do Pará, 2002. p.156-171.

VALE, W. G.; MAGALHÃES, A. N.; MAGALHÃES, D. M.; RIBEIRO, H. F. L. Testis growth, body weight and testicular size rates in the Brazilian Murrah buffaloes. In: International Congresso f animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil, **Abstracts...** Porto Seguro: ICAR, 2004, v. 1, p. 179.

VALE, W. G. Effects of environment on buffalo reproduction, **Italian Journal of Animal Science**, 6: sup 2,130-142. 2007.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Inheritance causes of buffalo bulls infertility in Brazil. **Buffalo Newsletter**, n.24, p.3-9, 2009.

VALE, W. G. Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. **Tecnología em marcha**. v. 24, n. 5, p. 89-104. 2011.

VALE, W. G.; MINERVINO, A. H. H.; NEVES, K. A. L.; MORINI, A. C.; COELHO, J. A. S. Buffalo under threat in Amazon Valley, Brazil. **Buffalo Bulletin**, v.32, n.1. 2013.

VALE FILHO, V. R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8, 1988, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1988. p.418-438.

VALE FILHO, V. R.; REIS, S. R.; PEREIRA, J. C. C.; CASTRO, V. M. Maturação sexual em touros Nelore com 24 meses de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl, n.1, p.202, 1989. Resumo.

VASCONCELOS, A. B. Bioquímica do Sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl, Belo Horizonte, n.6, p.32-35, dez. 2009. Disponível em www.cbra.org.br.

VILLARES, J.B.; RAMOS, A. A.; ROCHA, G.P. As vias cutâneas e respiratórias na termólise de bubalinos sob extrema tensão térmica. In: RAMOS, A. de A.; VILLARES, J.B.; MOURA, J.C. de. **Bubalinos**. Campinas: Fundação Cargill, 1979. p.55-68.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.639-658, 1993.

WITTWER, F. Empleo de los perfiles metabólicos en el diagnóstico de desbalances metabólicos nutricionales en el ganado. **Buiatria**, v. 2, p.16-20, 1995.

WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human. **Journal Andrology**, Malden, v. 22, p. 680-695, 2001.

WONG, W. Y.; FLIK, G.; GROENEN, P. M. W. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, 15, 131–136, 2001.

YASSEN, A. M.; MAHMOUD, M. N. Relationship between body weight and testicular size in buffalo bulls. **Journal of Agricultural Science**, (Camb), v.78, p.367-370, 1979.

YEUNG, C.H.; COOPER, T.G. Potassium channels involved in human sperm volume regulation, quantitative studies at the protein and mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, 75, 659 -668, 2008.

9. TRABALHOS PUBLICADOS E EM ANDAMENTO

Dentre os temas de artigos resultantes do doutoramento, e em fase de andamento, estão:

1. Dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso) e a influência nos dados físicos e morfológicos do sêmen (*in natura*) – PUBLICADO na revista “Animal and Veterinary Sciences”;
2. Dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso) correlacionados com dados de biometria (peso, circunferência escrotal e perímetro torácico);
3. Morfologia espermática analisada por 2 métodos: corante eosina-nigrosina com microscópio óptico e gota úmida com uso de microscópio de contraste de fase;
4. Teste hiposmótico correlacionado com dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso);
5. Análises de bioquímica seminal com uso de espectrofotômetro correlacionado com dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso);
6. Dados de ultrassonografia de bolsa escrotal de búfalos correlacionado com dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso);
7. Efeito de banhos no conforto térmico de bubalinos: parâmetros fisiológicos e registros em câmera infravermelha.
8. Dados de parâmetros fisiológicos correlacionado com dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso) para avaliar conforto térmico;
9. Dados hormonais e bioquímicos sanguíneos de bubalinos correlacionados com dados meteorológicos (período chuvoso e não-chuvoso);
10. Comparação de diluidores cebran II, triladyl® e andromed® na criopreservação de sêmen bubalino.
11. Integridade de membrana plasmática avaliada por 3 métodos: eosina-nigrosina, gota úmida e teste hiposmótico.

Animal and Veterinary Sciences

2017; X(X): XX-XX

<http://www.sciencepublishinggroup.com/j/avs>

doi: 10.11648/j.XXXX.2017XXXX.XX

ISSN: 2328-5842 (Print); ISSN: 2328-5850 (Online)

**Influence of Humid Tropical Environment on Buffalo Semen**

Sâmia Rubielle Silva de Castro^{1,3,*}, Adriana Caroprezzo Morini¹, Alanna do Socorro Lima da Silva¹, Kedson Alessandri Lobo Neves¹⁻³, Antônio Humberto Hamad Minervino¹⁻³, Anderson Alvarenga de Moura Meneses²⁻³, William Gomes Vale¹⁻³

1 Laboratory Animal Biotechnology, Institute of Biodiversity and Forests (IBEF), Federal University West of Pará, Santarém-Pará, Amazon, Brazil

2 Institute of Geosciences and Engineering (IEG), Federal University West of Pará, Santarém-Pará, Amazon, Brazil

3 Postgraduate Program on Society, Nature and Development (SND), Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém-Pará, Amazon, Brazil

Email address:

samiarubielle@hotmail.com (S. R. S. Castro)

*Corresponding author

Abstract

The present study was undertaken with the objective to compare the influence of the environment on some parameters of ejaculates of Murrah buffalo bulls raised in humid tropical Amazonian climate. Five buffaloes ($n=5$), average of age 2.5 ± 0.5 years and body weight 450.0 ± 35.5 kg were selected from a batch of 12 adult bulls, pre-evaluated for clinical and andrological examination, were used as semen donors, using as criterion the best ejaculate quality presented in the first semen collection. The experiment was carried out in the municipality of Santarém, western Pará state, in the Agricultural Exposition Park of the Rural Syndicate of Santarém were in confinement regime separated into individual stalls and fed with the grass *Echinochloa polystachya* (Canarana-de-pico) *ad libitum* and supplemented with two kg of a feed composed by corn, soy and sorghum and mineral salt. The animals had constant access to fresh and clean water, as well as mineral salt *ad libitum* in a trough. The sanitary control was carried out according to pre-established criteria for the species. The experimental period was divided into two phases: rainy season (RS), from February to May,

and non rainy season (nRS), from August to November 2016. The ejaculates were collected twice a week (n=30) per bull, namely 10 ejaculates in the RS and 20 ejaculates in the nRS period, totaling (n=150) samples for analysis, The evaluations of the semen samples were performed with fresh semen, immediately after each collection. The immediate analyzes pertinent to the physical and morphological characteristics of the ejaculates were carried out and corresponded in the RS the volume of 3.4 ± 2.0 mL, mass activity of 4.4 ± 0.5 , motility of $80.4 \pm 5.6\%$, Of 4.4 ± 0.4 , concentration of $657.300 \pm 237.865,1 \times 10^6$ sptz / mL, major defects $9.0 \pm 2.6\%$, minor defects $11.2 \pm 3.9\%$, total defects $20.2 \pm 5, 3\%$ and plasma membrane integrity (PMI) $84.8 \pm 5.6\%$, whereas in the nRS, the results were 4.0 ± 2.1 mL, mass activity 3.0 ± 1.0 , motility of $56.2 \pm 13.4\%$, vigour of 3.0 ± 1.0 , concentration of $586,000 \pm 291,925.9 \times 10^6$ sptz / mL, major defects $20.8 \pm 9.9\%$, minor defects $27.5 \pm 6.3\%$, total defects $48.3 \pm 9.3\%$, and PMI of $57, 9 \pm 12.4\%$. It was observed a significant statistical difference for the parameters wave motion, motility, vigor, major defects, minor defects, total defects and plasma membrane integrity between the both periods ($P < 0.05$).

Keywords: Amazon, Buffalo, Environment, Reproductive Parameters, Semen

1. Introduction

In recent years the study on the influence of the environment on animal production has become important [1, 2, 3]. Buffaloes are homeothermic animals and, as such, are able to maintain their body temperature within a wide range, using some physiological and behavioural mechanisms that aid in thermoregulation. As buffaloes are raised in different climatic environments, such aspects provide this species adapt to the most different ecosystems. The environmental temperature is one of the climatic factors with greater influence on the physical environment in which the animal is found [4, 5].

Due the fact that sexual behaviour depends directly on the production of hormones, especially those produced by the pituitary-gonads and adrenal axis, the hormonal secretion of these endocrine glands can be suppressed when some stressor agent acts. Thus, males subjected to thermal stress, have their sexual activity depressed, with less testosterone production, due to the production of stressors secreted by metabolism [1, 6, 7, 8, 9, 10].

In general, stress can be defined as any factor or change from the environment which interferes with homeostasis, which is a complex and dynamic system of equilibrium that governs the correct functioning of living organisms. Stress prevents animals from expressing

their full genetic potential, leading to reduced performance and detrimental reproductive efficiency [3, 10]. In addition, among the factors that cause imbalance of homeostasis, the most important are diseases, nutritional deprivation, incorrect handling of the herd, transportation and thermal stress, either by cold or heat. The ideal climatic conditions for the development and reproduction of buffaloes are considered to be ambient temperature between 13° and 18° C, associated with relative humidity between 55 and 65% average air, medium intensity sunshine and wind speed between 5 and 8 Km / h [11]. Thus, based on the climatic characteristics of the countries where the great majority of buffalo contingents are raised, it can be assumed that the real problem of buffalo production systems in tropical areas seems to be related to the heat caused by thermal stress [5].

Similarly, it has been reported that buffaloes have difficulty in dissipating body heat, due to having black pelt with a high content of melanin and lower amount of sweat glands [1, 12]. Furthermore, there is always the need for access to shade and water. Thus, good measures to maintain homeostasis include, firstly, preventing the animals from being exposed directly to intense solar radiation and, subsequently, facilitating the mechanisms of heat loss to the environment. In both cases, human's intervention with management practices have shown positive results [1,12].

Likewise, in males, thermal stress result into reduced seminal quality and lower viability of sperm [1, 3, 13]. Therefore, in much of Brazil environment conditions, especially in the humid tropical climate of the Amazon region, environmental management practices associated with animal management are fundamental for the sustainability of the buffalo production system [8].

Considering that the buffalo species presents reproductive seasonality, the variation in seminal quality may occur as a function of the season, with a greater reproductive activity in the autumn / winter seasons, which present the short days (hour x light) [10 , 13]. This variation occurs even in relation to testosterone, which surprisingly, in the literature consulted, shows lower blood concentrations in autumn and winter, which are the breeding seasons of buffalo than in spring and summer [14]. That being so, in regions where there are well-defined seasons during the year, it should be considered if there is any seasonal influence on seminal quality in this species [14]. Therefore, in the tropical humid Amazon rainforest environment, where climate is characterized by rainy and non-rainy periods, and the temperature and relative humidity remain very high throughout the year, causing discomfort

and thermal stress in farm animals, especially in buffalo, further studies were necessary to elucidate the real condition existing at local level [5, 8].

Thus, the present study aims to evaluate the influence of the environment on the reproductive parameters of buffaloes reared in the humid tropical Amazonian climate.

2. Material and methods

2.1 Study Area

The municipality of Santarém belongs to the mesoregion of the Lower Amazon is located (02° 26 '35 "S; 54° 42' 30" W). It runs straight from Belém city, capital of Pará state, distant 1,520 km. Part of the vegetation which cover of the municipality land scape is the equatorial broadleaf forest and the savannah fields located in the main land areas. The main river of the municipality is the Tapajós river, which crosses it in the South-North direction, in its low course ending at Amazon River, on the right bank of the municipal seat (Figure 1). The flood plain areas are predominant in the riverbanks and play an important role for the buffalo and cattle production systems. The environment temperature is always high, with annual average of 25.6 ° C, and the relative humidity of the air shows values above 80% during almost every month of the year. Rainfall is upper 2.000 mm per year, however, characterized by a certain irregularity of rainfall between the months of July and November, with the rainy season coinciding with the months of December to June [15].

In order to characterize the study area, a mini-station (WS-GP1 Weather Station, AT Delta-Devices Ltd) was installed at the experiment site to measure ambient temperature (°C), relative humidity, rainfall, Solar radiation (Wm-2) and wind speed (ms-1). The mini-station was located inside the bull station where the sires were stationed. Owing to distinct mean levels of ambient temperature, rainfall and humidity, for the purpose of the present study was divided the year into two seasons, namely (i) the rainy season (RS and (ii) non rainy season (nRS), corresponding to December-June through July-November, respectively.

2.2 Study Field and Animals

Five buffalo (n=5) bulls of Murrah breed, selected from a batch of 12 adult bulls, pre-evaluated for clinical and andrological examination, were used as semen donors, using as criterion the best ejaculate quality presented in the first semen collection. The experiment was carried out in the municipality of Santarém, western Pará state, in the Agricultural Exposition Park of the Rural Syndicate of Santarém. Donors age and body weight average was 2.5 ± 0.5

years 450.0 ± 35.5 kg at the begin of the experiment, respectively. The animals were kept in confinement regime, separated into individual stalls and fed with the grass *Echinochloa polystachya* (Canarana-de-pico) *ad libitum* and supplemented with two kg of a feed composed by corn, soy and sorghum and mineral salt. The animals had constant access to fresh and clean water, as well as mineral salt *ad libitum* in a trough. The sanitary control (anthelmintic and vitamin supplementation) was carried out according to pre-established criteria for the species, as well as vaccination against foot-and-mouth disease and testing for brucellosis and tuberculosis.

The experimental period was divided into two phases: rainy season (RS), from February to May, and the non rainy season (nRS), from August to November 2016. The ejaculates were collected twice a week between 06:00 and 07:00 AM. Prior to each collection, the animals received a shower on whole body and the preputial sac was cleaned and then were taken to the female in heat, contained in a squeeze.

Semen collections were performed using a medium length artificial vagina method, using model (Minitub model-Germany). Ejaculates (n=30) per bull, namely (n=10) in the RS and (n=20) ejaculates in the nRS period, totaling (n=150) samples for analysis, which were processed according to the methodology recommended for buffalo by [6, 16]. Seminal processing and laboratory analyzes were performed at the Animal Biotechnology Laboratory of the Federal University of the West of Pará.

The evaluations of the semen samples were performed with fresh semen, immediately after each collection. The immediate analyzes carried out were pertinent to the physical and morphological characteristics of the ejaculates, and corresponded to the measurement of volume, colour, appearance, mass activity (swirling), concentration of ejaculate, progressive motility, vigour, evaluation of plasma membrane integrity and sperm morphology [6,17].

The volume of the semen obtained in the samples was measured in a volumetric tube (mL), while the colour and appearance were evaluated in a visual scale [16], while the mass activity was evaluated by the sample of a drop of 20 μ L of semen on a preheated slide, observed on microscopy with a total increase of 40x, receiving scoring from 0 to 5 (0, ejaculated with absence of waves and 5, presence of many sperm waves, moving rapidly), according [6, 17].

The sperm concentration was made by counting in a Neubauer haematimetric chamber under light microscopy. The total number of spermatozoa was given in millions of cells per mL [6, 17].

The sperm motility was evaluated by optical microscopy, with a total increase of 40x. Each 10 μL sample of semen was deposited on a pre-heated blade and cover slip. The results were expressed as percentage of cells with progressive motility. While vigour was evaluated on the same slide on which motility was assessed, under the same magnification. Their evaluation was given in a scale ranging from 0 to 5 (0: absence or weak sperm movement up to 5: strong movement), according [6, 17].

To evaluate the sperm morphology, the semen samples were fixed in buffered formalin solution and evaluated in the preparation of a conventional wet drop, observed under phase contrast microscopy, with a total increase of 1000x (Leitz, Germany). 200 spermatozoa per sample were counted and classified, with structural defects expressed as percentages of minor defects, major defects, and total defects [6,17,18].

The integrity of the sperm plasma membrane was also evaluated by the hyposmotic test, according [19, 20]. The hyposmotic solution was prepared with 0.735 g of sodium citrate and 1.351 g of fructose for 100 mL of distilled water (osmotic pressure of 190 mOsm kg^{-1}). Samples for evaluation were prepared by adding 50 μL of semen to 500 μL of hyposmotic solution. Then, the samples were incubated at 37 ° C for 30 minutes. After incubation, a 10 μL of each sample was examined under a phase contrast microscope, under a total magnification of 1000 \times . Two hundred spermatozoa were counted and classified, so that changes (curvatures) in the tail of the spermatozoa after the test indicated that the cell had a normal plasma membrane, which was considered to be completely functional from the functional point of view. Already the spermatozoa that did not present curvature in the tail were considered as having damaged plasma membrane.

2.3 Statistical Analysis

The meteorological data were evaluated using the general linear model (GLM), where as semen and sperm data were examined using the repeated measures statement of the MIXED procedure (Proc MIXED) of the Statistical Analysis Systems software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The model included the fixed effects of season. A Generalized Estimation Equation GEE test was used to determine differences between colour and aspect variables. The differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. Meteorological variables were tested for normality with Shapiro-Wilk test, and if data were not normal the Kruskal-Wallis test was performed.

3. Results

The meteorological data obtained on the environmental conditions - air temperature, relative air humidity, solar radiation and rainfall are presented in Table 1. They differ statistically in the two periods (RS and nRS). With the exception of wind speed, there was no significant difference between the two periods.

Table 1 - Variables found in the different stations, in the course of the present study, based on the data obtained by the WS-GP1 Meteorological Station, AT Delta-Devices Ltd, in Santarém municipality Pará state, between March and November 2016 (mean \pm SD). The rainy season: March - June; Non-rainy season: July to November 2016.

Season	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	Rainfall (mm)	Solar radiation (w.m-2)	Wind speedy (m.s-1)
Rainy season	28,1 \pm 1,8 ^a	89,4 \pm 10,2 ^a	2.418 \pm 309 ^a	232,7 \pm 301,3 ^a	1,6 \pm 0,7 ^a
Non rainy season	29,4 \pm 1,9 ^b	79,0 \pm 10,6 ^b	381 \pm 95 ^b	260,6 \pm 314,0 ^b	2,0 \pm 1,0 ^b

a, b Means with different superscripts within a column indicate significant differences within variables ($P < 0,005$).

The physical and morphological characteristics of buffalo bull semen through the rainy season (RS), corresponding to volume, colour, aspect, mass activity (swirling), progressive motility, vigour, concentration, sperm morphology and plasma membrane integrity of the ejaculates are described in Table 2.

From the analysis of Table 2, it can be observed that no statistical differences were detected regarding the quantity and quality of the different parameters of ejaculates, in none of the characteristics above evaluated throughout the RS. All ejaculates were within the normality patterns described for the species, according to [6, 17].

Table 2 - Physical and morphological characteristics of buffalo ejaculates, in the rainy season (March to May) (n = 50). Santarém municipality, Pará state, 2016.

Semen parameters	Buffalo bull number				
	1	2	3	4	5
Volume (mL)	2,9 \pm 1,5	2,0 \pm 0,5	2,3 \pm 0,8	2,9 \pm 1,0	6,7 \pm 1,7
Colour	White/ White- yellowish/	Yellowish/ white/white -yellowish	White/ white- marble	White/ white- marble	White/ white- yellowish
Aspect	Watery/ Milky	Milky	Milky	Milky	Milky
Mass activity (0-5)	4,2 \pm 0,8	4,6 \pm 0,5	4,3 \pm 0,5	4,3 \pm 0,5	4,7 \pm 0,6

(Swirling)					
Motility (%)	80,0 ± 4,1	80,0 ± 5,3	75,5 ± 4,4	84,0 ± 3,9	82,5 ± 7,2
Vigour (0-5)	4,5 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,7 ± 0,5
Concentration (x10⁶sptz/mL)	586.000 ± 254.567,2	565.000 ± 116.952	856.000 ± 266.216,3	546.500 ± 188.812,8	733.000 ± 209.833,6
Major defects (%)	10,1 ± 2,3	10,5 ± 1,9	9,8 ± 1,2	9,7 ± 1,3	5,0 ± 2,1
Minor defects (%)	11,4 ± 2,6	11,5 ± 2,1	11,4 ± 6,2	12,8 ± 3,4	9,0 ± 4,2
Total defects (%)	21,4 ± 3,0	22,0 ± 3,6	21,1 ± 6,3	22,5 ± 4,2	13,9 ± 4,5
Plasma membrana Integrity (Hyposmotic test) (%)	84,1 ± 5,4	90,0 ± 1,9	83,3 ± 5,1	79,5 ± 5,1	87,4 ± 3,9

The physical and morphological characteristics of buffalo semen in the non-rainy period (nRS), corresponding to volume, colour, appearance, swirling, progressive motility, vigour, concentration, sperm morphology and plasma membrane integrity of the ejaculates are shown in Table 3.

With reference to the colour parameter of the ejaculates, the shades were yellowish, white, yellowish-white and white-marbled, while to the aspect were observed the aqueous, serous and milky characteristics. For the volume through the RS and nRS the mean was 3.4 ± 2.0 and 4.0 ± 2.1 , respectively.

The data on concentration, colour, appearance and volume did not present statistical difference between the periods. The relative values for the mean concentration in RS and nRS were $657.300 \pm 237.865.1$ and $586.000 \pm 291.925.9$, respectively.

The wave motion, motility, vigor, major defects, minor defects, total defects and plasma membrane integrity showed a significant statistic difference between both periods ($P < 0.05$).

Table 3 - Physical and morphological characteristics of buffalo ejaculates in the non-rainy period (August to November) (n = 100). Santarém municipality, Pará state, 2016.

Semen parameters	Buffalo bull number				
	1	2	3	4	5
Volume (mL)	5,6 ± 2,6	2,6 ± 1,2	2,2 ± 0,6	3,9 ± 1,1	5,9 ± 1,6
Colour	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/	Branco/ branco- amarelada/
Aspect	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso	Leitoso/ Aquoso
Mass activity (0-5) (Swirling)	2,4 ± 1,0	2,9 ± 1,1	3,0 ± 1,1	3,0 ± 0,7	3,8 ± 0,8
Motility (%)	58,3 ± 14,6	49,3 ± 12,2	48,3 ± 13,8	64,8 ± 9,0	60,5 ± 9,7

Vigor (0-5)	3,2 ± 0,8	3,3 ± 0,6	3,6 ± 0,6	4,1 ± 0,2	3,4 ± 0,7
Concentration (x10⁶sptz/mL)	342.750 ± 172.813,2	800.000 ± 306.963,1	708.250 ± 287.847,2	477.750 ± 195.740,7	601.250 ± 244.910,7
Major defects (%)	13,3 ± 2,5	35,2 ± 8,6	26,0 ± 4,9	15,5 ± 3,6	14,2 ± 4,0
Minor defects (%)	29,7 ± 5,3	24,1 ± 4,6	25,0 ± 3,4	31,6 ± 8,3	27,2 ± 6,0
Total defects (%)	43,0 ± 6,2	59,4 ± 8,4	50,9 ± 4,6	47,1 ± 8,2	41,4 ± 6,5
Plasma membrana integrity (Hyposmotic test) (%)	60,9 ± 9,7	56,7 ± 12,6	62,6 ± 10,5	49,9 ± 15,2	59,2 ± 10,6

With respect to the mass activity parameter (swirling) in RS and nRS, they varied from 3 to 5, with a mean of 4.4 ± 0.5 and of 1 to 5, with an average of 3.0 ± 1.0 , respectively. However, there was no statistical variation between the animals in these periods, but a statistical difference between the two periods (RS and nRS) occurred.

In the present study, it was verified that progressive sperm motility presented a decrease in the values during the different phases of the experiment. The progressive motility of the semen *in natura* ranged from 70% to 95%, with a mean of $80.4 \pm 5.6\%$ in RS and decreased in nRS, with collections obtained varying from 20% to 75%, but with a mean of $56.2 \pm 13.4\%$.

Regarding the vigor, both RS and nRS, in the *in natura* semen it ranged from 4 to 5, with a mean of 4.4 ± 0.4 and 2 to 5, with a mean of 3.5 ± 0.6 , respectively.

For larger defects in RS and nRS, the mean data obtained were $9.0 \pm 2.6\%$, ranging from 1.5 to 15.0% and $20.8 \pm 9.9\%$, ranging from 10.5 to 50.5%, respectively. For minor defects in RS and nRS, mean data were $11.2 \pm 3.9\%$, with values obtained between 3.4 and 24.0% and mean values of $27.5 \pm 6.3\%$, ranging from 15.5 to 54, 5%, respectively. For total defects, the mean values obtained were $20.2 \pm 5.3\%$ for RS, ranging from 7.0 to 32.5%; and mean data of $48.3 \pm 9.3\%$ in nRS ranged from 32.5 to 76.5%, Table 4.

Table 4 - Average physical and morphological characteristics of buffalo ejaculates, in the rainy season (March to May) and non-rainy (August to November) (n = 100). Santarém, municipality, Pará state, 2016.

Seminal parameters	Rainy season (RS)	Non rainy season (nRS)
Volume (ml)	3,4±2,0 ^a	4,0±2,1 ^a
Mass activity (0-5) (Swirling)	4,4±0,5 ^a	3,0±1,0 ^b
Motility (%)	80,4±5,6 ^a	56,2±13,4 ^b
	4,4±0,4 ^a	3,0±1,0 ^b

Vigour (0-5)		
Concentration (x10⁶sptz/mL)	657.300±237.865,1 ^a	586.000±291.925,9 ^a
Major defects (%)	9,0±2,6 ^a	20,8±9,9 ^b
Minor defects (%)	11,2±3,9 ^a	27,5±6,3 ^b
Total defects(%)	20,2±5,3 ^a	48,3±9,3 ^b
Plasma membrane integrity (Hyposmotic test) (%)	84,8±5,6 ^a	57,9±12,4 ^b

a, b Means with different superscripts within a row were significantly different between seasons ($P < 0,005$).

With respect to plasma membrane integrity, data on RS were $84.8 \pm 5.6\%$, ranging from 69.5 to 92.5%. Already in the nRS was $57.9 \pm 12.4\%$, with a range of 16.0 to 91.5%.

In Table 4, was observed that in the RS the obtained seminal analyzes showed ejaculates with volume of 3.4 ± 2.0 mL, swirling of 4.4 ± 0.5 , motility of $80.4 \pm 5.6\%$, Of 4.4 ± 0.4 , concentration of $657.300 \pm 237.865,1 \times 10^6$ sptz / mL, major defects $9.0 \pm 2.6\%$, minor defects $11.2 \pm 3.9\%$, total defects $20.2 \pm 5, 3\%$ and membrane integrity $84.8 \pm 5.6\%$, whereas in the nRS, the results were 4.0 ± 2.1 mL, swirling 3.0 ± 1.0 , motility of $56.2 \pm 13.4\%$, vigour of 3.0 ± 1.0 , concentration Of $586.000 \pm 291.925.9 \times 10^6$ sptz / mL, major defects $20.8 \pm 9.9\%$, minor defects $27.5 \pm 6.3\%$, total defects $48.3 \pm 9.3\%$, and plasma membrane integrity of $57, 9 \pm 12.4\%$.

4. Discussion

By the analysis of the results obtained in the present experiment, Table 2, 3 and 4, they are according to the data tabulated by [3] that reported ejaculates with better reproductive characteristics in periods of milder temperatures of the year. They also concluded that in warmer months the ejaculates are negatively affected in several characteristics.

In experiment [9], in Thailand (tropical climate), semen collections were performed between winter and spring, when temperatures were mild. For buffaloes, this period was considered more suitable for the collection of semen, destined for freezing, since the ejaculates collected during these months of the year presented higher membrane integrity and stability, as well as better values for the movement (speed) patterns provided by CASA to the samples which were thawed, and no effect was observed on the quality of the ejaculates. The same authors did not observe significant differences in seminal characteristics in the different seasonal periods in ejaculates of buffalo bulls, with the exception of tail defects (morphology), which increased in the months of higher temperatures. Differently from what occurred in the present experiment, there were significant statistical differences for motility,

vigour, mass activity, plasma membrane integrity, major defects, minor defects, and total defects [1, 4, 5, 6].

Hence, the photoperiod is an important factor that influences the seminal characteristics of buffaloes [13] and it has been reported the influence of the humid tropical Amazonian environment on the reproduction and sexual activity of buffalo bulls, not only affecting the libido but also on the quality of fresh and freezing of semen [1]. Thus, the results found by these authors corroborate to the data found in the present research, in which the environment influences the seminal characteristics in buffaloes

In adult buffaloes, there is a variation of seminal quality as a function of the time of year, which can be attributed, mainly, to an effect of the temperature of the environment on the animal and, consequently, on the spermatogenesis. [21], has been already reported that during the summer months. the percentage of live spermatozoa in ejaculates of adult buffaloes is $64.6 \pm 4.4\%$, deliberately lower than the data obtained in autumn, winter and spring, when they are obtained values of $90.5 \pm 0.8\%$, $84.5 \pm 2.3\%$ and $95.7 \pm 1.5\%$, respectively.

On the other hand evaluation on the semen characteristics of zebu (*Bos indicus*) bull and buffalo bulls ejaculates kept at an artificial insemination center in the Pará donors, in the Brazilian humid tropics showed also differences between RS and nRS [22] . In order to carry out the comparison, the data of six consecutive years on ejaculates collected during the most rainy season of the year (January to June) and during the least rainy season (July to December) were grouped. The buffalo bulls showed differences in seminal quality, always favourable to the ejaculates produced in the RS of the year. Sperm motility was the attribute that presented differences, both in the *in natura* semen ($74.20 \pm 9.87\%$ versus $70.17 \pm 9.89\%$), and after the dilution ($75.62 \pm 6.95\%$ versus $73.12 \pm 8.17\%$) and after thawing ($54.50 \pm 9.68\%$ versus $49.30 \pm 10.74\%$). No differences were observed between seasons for the characteristics of seminal volume, sperm concentration, mass activity, vigour and sperm defects (major, minor and total). Already in the present experiment, there was no significant statistical difference for volume, colour, appearance and sperm concentration.

Thus, it can be stated that the periods of the year influenced the seminal characteristics, since in the phase of better thermal comfort, the seminal quality was superior. Warmer months had a negative effect on seminal quality, where as in the same animals, in rainy months, they had better seminal characteristics, as was observed in the present work.

Even though in the temperate regions of the world, it was found that semen is of better quality during winter and spring than in summer and fall [23, 24], while in tropical regions,

semen quality was considered satisfactory during the RS. In the hot and humid tropical region of the Amazon, the best time for semen harvesting and processing is between January and June [6], which corresponds to the rainy season. Because buffaloes are very sensitive to thermal stress, it is natural they experience a decline in the quality of ejaculates, and is therefore a common finding during hot seasons of the year.

The management of buffaloes, including feed and facilities, as well as the age of the male, also have influence on semen production and quality [25]. The best-quality semen with respect to sperm morphology was observed in Murrah breed bulls aged 3 to 5 years [25, 26] and in Nili-Ravi breed buffalo bulls [27].

Therefore, it seems obvious that in humid tropical Amazonian region, the best time for process semen for deep freezing is during the rainy season, although such practice can also be used throughout the year since an improve management is used to protect the buffalo donors which consist to keep the animals in shady environment and baths during the hottest hours of the day [1, 4, 5, 6].

In the present work, the results for *in natura* semen are in accordance with the characteristics of normality described for buffalo semen described by [6, 16, 17], after collection by artificial vagina, with a minimum volume of 3 mL, minimum vigour of 3, Motility higher than 70%, plasma membrane integrity above 70% and total defects not greater than 30%, obtained during the RS of the present experiment.

According to Vale [6, 16], a good quality buffalo ejaculate presents volume ranging from 1.0 to more than 3.0 mL, sperm concentration of 600 to 1.200 million sperm per mL [12], minimum swirl of 3 (scale from 0 to 5), sperm motility between 60 and 80%, vigor of at least 3 (scale from 0 to 5) and pH between 6.5 and 7.2; a similar data was obtained in the RS of the present experiment. Already [28] mentions that the minimum standards for the classification of a "probably fertile" sample of buffalo semen are: 500 million spermatozoa per mL, more than 60% mobile spermatozoa with rectilinear progression and more than 70% spermatozoa with normal morphology.

Notwithstanding, to some authors [6, 16, 29, 30, 31] they agree that the volume of buffalo semen varies from 2 to 3 ml for young animals in the age group of two to three years and from 4 to 6 ml for animals above of four years, with concentration varying from 0.8 to 1.5 x 10⁹ spermatozoa / ml and motility of 70-80%, aspects also observed in the present study.

Some authors stated that colour of the normal buffalo ejaculate is milky-white to grayish, and volume rarely exceeding 5 mL, as [32]. The same authors note that the sperm

concentration is between 300 and 1.500 million cells per mL, aspects which are in accordance with the results here obtained.

The mean progressive motility data of the *in natura* semen obtained in this study were higher than those described by [28], which reported an average value of 75.0%. They were also superior to the desirable minimum parameters recommended by the CBRA (2013) for *in natura* semen, that is, progressive motility of 70%, vigour 3, swirling 3 and total of abnormal spermatozooids of 30%, although these parameters are extrapolated from the bovine species to buffalo. The excellent indicators observed in the *in natura* semen in the present study seem to be related, among other aspects, to the experimental rigor used in the selection of donor bulls and their ejaculates.

As the nRS negatively influences the seminal quality, it should be sought during this period to improve the thermal comfort of the animals to use them in programs of semen collection, for freezing.

5. Conclusion

In regions where the tropical temperature predominates, as in the Amazonian Region, with a humid tropical climate, special management needs to be implemented. Thus, it is recommended that the animals have access to daily baths, especially during hot weather, which can be done with the use of showers, sprinkler or lakes, so that they can dissipate body heat from metabolism and that caused by environment. Because it is more sensitive to heat, special attention should be paid to animals subjected to semen collection during the hottest season of the year. It is very important the protection of animals against thermal stress, providing the free access of the animal to the bath and the shade, since this species has greater difficulty to dissipate body heat, because it has a smaller amount of sweat glands and therefore a thermoregulatory system less efficient when compared to *Bos indicus* cattle.

References

- [1] Vale, W. G. (2007). Effects of environment on buffalo reproduction, *Italian Journal of Animal Science*, 6: sup 2,130-142.
- [2] Sharma, L., Pandey, V., Nigam, R., Singh, P., Saxena, A., and Swain, D. K. (2014). Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*, 49 (3), 387-391.

- [3] Bhakat, M., Mohanty, T. K., Gupta, A. K., Prasad, S., Chakravarty, A. K., and Khan, H. M. (2015). Effect of season on semen quality parameters in Murrah buffalo bulls. *Buffalo Bulletin*, 34(1), 100-112.
- [4] Titto, E. A. L., Russo, H. G., Lima, C. G. (1997). Efeito do banho de água sobre o conforto térmico de bubalinos. In: Congresso de Zootecnia, 6, 1997, Lisboa. Actas... Lisboa: APEZ (1):15-18.
- [5] Garcia, A. R. (2013). Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37 (2): 121-130.
- [6] Vale, W.G.(1994). Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo Journal*, suppl. 2: 65-81.
- [7] Squires, E. J. (2003). Applied animal endocrinology. Walingford: CABI Publishing. pp.192-229
- [8] Garcia. A. R. (2006). Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*) *Revista de Ciências Agrárias* nº 45. Suppl.
- [9] Koonjaenak, S., Chanatinart, V., Aiumlamai, S., Pinyopumimintr, T., and Rodriguez-Martinez, H. (2007). Seasonal variation in semen quality of swamp buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) in Thailand. *Asian journal of andrology*, 9 (1), 92-101.
- [10] Phogat, J. B., Pandey, A. K., Singh, I. (2016). Seasonality in buffaloes reproduction. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 6(2): 46-54.
- [11] Marai, I. F. M., Haebe, A. A. M. (2010). Buffalo's biological functions as affected by heat stress - a review. *Livestock Science*, 127, p.89-109.
- [12] Vale, W. G. (2011). Avances biotecnológicos em reprodução de búfalos. *Tecnología em marcha*. v. 24 (5): 89-104.
- [13] Sansone, G., Natri, M. J. F., Fabbrocini, A. (2000). Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal reproduction science*, 62 (1): 55-76.
- [14] Ohashi, O. M., Santos, S. S. D., Miranda, M. S., Cordeiro, M. S., Costa, N. N., and Silva, T. V. G. (2011). Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 35 (2):88-94.

- [15] Souza, I. M. P., Costa, A. C. L., Silva Junior, J. A., Feitosa, J. R. P. (2011). Estudo do conforto térmico em cidades de diferentes dimensões no estado do Pará. In: Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 17, 2011, Guarapari, ES. Actas... Guarapari: SESC (1):1-5.
- [16] VALE, W.G. (2002). Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: Buffalo Symposium of Americas, 1, Belém, PA, 2002. Proceedings ... Belém: APCB. pp. 156-171.
- [17] CBRA - Colégio Brasileiro Reprodução Animal (2013). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA. pp. 104.
- [18] Blom, E. (1973). The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification on the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed.*, 25: 383-391.
- [19] Rasul, Z.; Anzar, M.; Jalali, S.; Ahmad, N. (2000). Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59: 31-41.
- [20] Barros, P. M. H., Nichi, M., Cortada, C. N. M., Carvalho, N. A. T., Baruselli, P. S., Barnabe, R. C., Barnabe, V. H. (2007). Semen evaluation of Murrah buffalo bulls using sperm functional tests. In: World Buffalo Congress, 8 (6) Caserta-Itália. **Proceedings...** Caserta, 2007, pp.772-774.
- [21] Gangwar, P. C. (1980). Climate and reproduction in buffaloes – a review. *The indian journal of dairy science*, 33:419-426.
- [22] Coimbra, A. S. (2002). Características seminais de touros bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*), taurinos (*Bos taurus taurus*) e bubalinos (*Bubalus bubalis*), doadores de sêmen em condições de trópico úmido amazônico. 78f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.
- [23] Galli, A., Bornaghi, V., Balduzzi, D., Buttazzoni, L., Aleandri, R., (1993). Sexual behaviour and semen quality relating to italian buffalo. Proc. 3rd World Buffalo Congr., Varna, Bulgaria (1) pp. 562–570.
- [24] Mohan, G., Sahni, K.L., (1990). Efficiency of semen production in buffalo bulls. In: Acharya, R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, S. _Eds..., Recent Advances in Buffalo Research (3) pp. 14–16.

- [25] Chinnaiya, G.P., Ganguli, N.C., (1990). Effect of age and season on the initial attributes and preservability of buffalo bull semen. In: Acharya, R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, S. _Eds..., Recent Advances in Buffalo Research (3) pp. 80–86.
- [26] Kumar, S., Sahni, K. L., Mohan, G. (1994). Effect of yolk, glycerol and sugars on post-thaw survival of buffalo spermatozoa in TRIS dilutor. *Indian Journal Animal Science*, New Delhi, v.64 (4): 362-364.
- [27] Saeed, A., Chaudhry, R.A., Khan, I.H., Khan, N.U. (1990). Morphology of semen buffalo bulls of different age groups ,in: R.M. Acharya, R.R. Lokeshwar, S. Kumar (Eds.), Recent Advances in Buffalo Research, vol. 3, pp. 17–19.
- [28] Barnabe, V. H. (1999). Colheita e avaliação o sêmen de búfalos. In: Anais do 1o Simpósio Paulista de Bubalinocultura, Jaboticabal, Brasil. Jaboticabal: Funep. pp. 122-125.
- [29] Javed, M. T., Khan, A., Kausar, R. (2000). Effect of age and season on some semen parameters of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Veterinarski Arhiv*, v. 70 (n. 2):83-94.
- [30] Pant, H. C., Sharma, R. K. , Patel, S. H. , Shukla, H. R., Mittal, A. K., Kasiraj, R., Misra, A. K., Prabhakar. (2003). Testicular development and its relationship to semen production in murreh buffalo bulls. *Theriogenology*, v.60: 27-34.
- [31] Ohashi, O. M.; Baruselli, P. S. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas em bubalinos. In: Biotécnica aplicadas à Reprodução Animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. pp.105-123.
- [32] Jainudeen, M. R., Hafez, E. S. E. (2004). Bovinos e Bubalinos. In: Hafez, ESE, Hafez, B. Reprodução Animal. Barueri, Brasil: Manole. pp. 159-171.