

Efeito do temperamento e estresse na qualidade e fertilidade do sêmen bovino

Effect of temperament and stress in the quality and fertility of bovine sperm

André Maciel Crespilho^{1,2,3*}, Mariana Karla Francolino da Silva^{2,4}, Matheus Henrique Vargas de Oliveira¹, Marcelo Sant'Anna Borges⁵, Guilherme Rizzoto⁶

¹Central Bela Vista, Botucatu, Brasil; ²VetSemen, Análise de Sêmen para Inseminação Artificial, Barueri, Brasil; ³Programa de Pós-Graduação em Saúde Única, Universidade Santo Amaro, UNISA, Brasil; ⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (VRA-USP), Universidade de São Paulo, Brasil; ⁵Instituto de Zootecnia (IZ), Sertãozinho, Brasil; ⁶Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Faculty of Veterinary Sciences, Ghent University, Ghent, Bélgica

Resumo

A qualidade e fertilidade do sêmen de touros representam parâmetros complexos, porém com equilíbrio delicado, que podem ser influenciados por diversos fatores. Um aspecto pouco considerado, porém, de fundamental importância é o temperamento do macho. Touros com temperamento agressivo tendem a apresentar queda na performance reprodutiva a campo, com prejuízos à termorregulação testicular, determinando redução nas taxas de fertilização em programas de monta natural. Além disso, o estresse também exerce impacto significativo sobre todos os aspectos que envolvem a reprodução de machos bovinos. Situações relacionadas a estresse térmico (mudanças climáticas e exposição a altos índices de temperatura e umidade ambiental), problemas de manejo, questões relacionadas a interação social e estabelecimento de dominância, bem como déficits nutricionais ou oferta de dietas desbalanceadas resultam em falhas no processo de espermatogênese, com consequente queda na fertilidade animal. Tendo em vista o impacto econômico e biológico dos problemas de fertilidade relacionados a temperamento e estresse animal, torna-se importante o conhecimento dos fatores desencadeantes das condições estressantes para que medidas de controle e mitigação possam ser implementadas.

Palavras-chave: Estresse; Fertilidade; Qualidade espermática; Temperamento; THI.

Abstract

Bovine fertility and sperm quality are complex processes, yet with a delicate balance that can be impaired by different factor. An aspect not often considered is the temperament of the male. Bulls with more aggressive behavior, tend to present worse breeding performances on the field. In addition, stress in a general perspective, has strong impact on reproductive soundness of bulls. Exposure to heat stress (derived from climatic changes and exposure to high temperature and humidity index), problems related to poor management conditions during the animal handling, bad social interactions within the herd and unbalanced diets and negative energy balance can also affect spermatogenesis and herd fertility. Considering the economic and biological impact of fertility problems related to animal temperament and stress, it is important to know the triggering factors of stressful conditions so that control and mitigation measures can be implemented.

Key-words: Fertility; Sperm quality; Stress; Temperament; THI.

Temperamento bovino

Temperamento refere-se às variações individuais no comportamento que surgem desde o nascimento e permanecem consistentes em diversas situações, especialmente em cenários desafiadores (MacKay e Haskell, 2015). O temperamento é o que determina como um indivíduo reagirá a um estímulo: sua resposta comportamental pode ser de luta ou fuga; sua resposta fisiológica pode envolver a produção de adrenalina ou cortisol e sua resposta psicológica pode se manifestar na expressão de sentimentos positivos ou negativos (Qiu et al., 2017). Nesse contexto, o temperamento animal pode ser considerado como a resposta comportamental de um animal frente ao manejo e interação humana (Fordyce et al., 1998).

*Correspondência: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

Recebido: 29 de abril de 2023

Aceito: 25 de maio de 2023

O temperamento pode ser influenciado pela experiência prévia do contato com humanos, resultando em efeitos tanto positivos quanto negativos na expressão do comportamento (Sant'Anna e Paranhos da Costa, 2010). Determinados estímulos negativos comuns no manejo de bovinos, como a contenção no tronco, gritos e o uso de bastões de choque, tendem a intensificar a sensação de medo nos animais. Esse medo, por sua vez, tem um impacto significativo nos níveis de estresse e no comportamento animal (Paranhos da Costa, 2000). Nesse cenário, o medo é reconhecido como um dos principais fatores psicológicos ligados ao temperamento (Adamczyk et al., 2013), representando o principal motivo responsável pelas reações defensivas observadas em bovinos quando submetidos a manejos agressivos (Lanier et al., 2000; Pajor et al., 2000). Em contrapartida, boas práticas de manejo podem desempenhar reações positivas nos animais, observadas pela redução do medo e das respostas defensivas quando em contato com humanos (Petherick et al., 2009).

Influência do temperamento na qualidade do sêmen bovino

Bovinos considerados reativos apresentam ativação mais intensa e prolongada do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, resultando em maiores concentrações séricas de cortisol em comparação a animais mais calmos (Cooke et al., 2012). Desse modo, o cortisol atua inibindo a liberação de GnRH pelo hipotálamo e, consequentemente, reduzindo a produção das gonadotrofinas pela hipófise (Von Borell et al., 2007). Dessa forma, estudos em humanos têm demonstrado que alterações neuroendócrinas decorrentes do estresse podem levar a redução da produção de testosterona, com potencial impacto na espermatogênese e qualidade espermática (Zou et al., 2019). Da mesma forma, touros mais susceptíveis ao estresse (maiores concentrações de cortisol em situações desafiadoras) também enfrentam consequências na qualidade do sêmen, apresentando ejaculados com menor volume e concentração espermática (Chernenko et al., 2019). Lockwood et al., (2017) observaram que touros jovens e de temperamento mais calmo apresentaram maior percentual de células morfolologicamente normais em relação a animais reativos da mesma faixa etária. No entanto, estudos anteriores não observaram relação entre efeito do temperamento sobre a qualidade espermática de touros adultos (Adamczyk et al., 2013; Braz et al., 2020; Martin et al., 2021). Lanier et al., (2000) indicaram que animais mais jovens possuem menor capacidade de adaptação a eventos estressantes quando comparados a bovinos mais velhos, indicando que a idade exerce influência sobre a expressão do temperamento de touros.

Influência do temperamento sobre a fertilidade do sêmen de touros

Estudos anteriores têm demonstrado que o temperamento bovino pode influenciar a fertilidade de machos e fêmeas. Na fêmea, o temperamento reativo induz a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, comprometendo o suporte adequado de LH para o folículo ovariano e levando à redução da produção de estradiol e queda da taxa de crescimento folicular (Vedovatto et al., 2021). Como resultado, fêmeas bovinas reativas apresentam pior desempenho reprodutivo em comparação às mais calmas, incluindo menores taxas de prenhez (Brandão e Cooke, 2012), anestro prolongado e maior número de perdas gestacionais (Kasimanickam et al., 2014).

Da mesma forma, a reatividade parece influenciar o desempenho reprodutivo de machos bovinos. Braz et al., (2020) observaram que touros Nelore de maior reatividade apresentaram temperatura escrotal mais elevada (em torno de 1°C) em comparação a animais calmos; tais resultados demonstram a influência direta do temperamento sobre a termorregulação testicular, mecanismo fisiológico crucial para a fertilidade masculina (Rizzoto e Kastelic, 2020).

Comparando a eficiência reprodutiva de touros Nelore em programa de monta natural, Martin et al., (2021) observou maiores taxas de concepção para fêmeas acasaladas com touros de temperamento calmo (84%) em comparação a touros reativos (76%; $P=0,001$). Bovinos reativos são mais propensos a se distrair por estímulos externos, permanecendo constantemente em estado de alerta (Estévez-Moreno et al., 2021), o que pode ocasionar menor número de interações (montas) com as vacas e, por consequência, redução nas taxas de concepção.

Estresse, qualidade e fertilidade espermática

Muitas definições para estresse podem ser encontradas na literatura, sendo que de uma maneira geral o termo representa uma reposta inespecífica, física, comportamental, imunológica e endocrinológica de um organismo frente a agentes estressores. Geralmente o estresse pode ser classificado como físico (agressões, restrições e privações [especialmente de alimento]), psicológicos (barulho, manejos,

isolamento, aglomeração, transporte) e ambientais (estresse térmico), que põe em risco a homeostase, com consequente queda no desempenho animal (Fernandez-Novo et al., 2020).

Estresse térmico

As mudanças climáticas representam uma das maiores preocupações no contexto da produção pecuária Mundial. De acordo com North et al., (2023) 77% dos bovinos do Mundo são expostos a situações de estresse térmico por pelo menos 30 dias ao ano, sendo a situação mais preocupante em países de clima tropical, onde 20% dos animais vivenciam o estresse de maneira contínua e diária, resultando em maiores taxas de mortalidade e redução no desempenho produtivo e reprodutivo. O aumento da temperatura ambiental causado pelas mudanças climáticas gera impactos negativos sobre a fisiologia e bem-estar animal, sendo reportados efeitos deletérios sobre o ambiente uterino, qualidade ovocitária e embrionária de fêmeas bovinas (Llamas-Luceño et al., 2020).

Da mesma forma, o estresse térmico ambiental é capaz de produzir efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva de machos bovinos. Estudos anteriores demonstraram que tais efeitos se manifestam de forma independente ao genótipo (touro *Bos indicus* caracterizados como termorresistentes; animais *Bos taurus* como termossensíveis), variando apenas na intensidade dos impactos observados (Brito et al., 2004). De forma geral, é fundamental a ocorrência de um gradiente de 3-5 °C entre a temperatura corpórea e testicular para adequada ocorrência da espermatogênese (Kastelic et al., 2018). Quando expostos a temperaturas elevadas, onde os mecanismos fisiológicos de termorregulação se tornam ineficientes, se observam os quadros de hipertermia testicular, que dentre outros fatores, levam ao aumento do fluxo sanguíneo local (Kastelic et al., 2021; Rizzoto et al., 2020), com maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), associado à elevação da incidência de defeitos espermáticos maiores em função do aumento da temperatura ambiente (Nichi et al., 2006).

Apesar de diversos estudos relevantes apresentarem uma modulação artificial da temperatura ambiental, com utilização de câmaras climáticas (Kastelic et al., 2017) ou da temperatura testicular através da insulação da bolsa escrotal ou do cone vascular testicular (Rizzoto et al., 2020), as variações climáticas atuais e o aquecimento global, vem direcionando pesquisadores ao redor do mundo a avaliar o aumento e variação dos índices de temperatura e umidade (THI) ao longo das diferentes estações do ano, sendo buscadas estratégias para mitigar os efeitos deletérios do estresse térmico sobre a capacidade reprodutiva de touros.

Índice de temperatura e umidade e variações sazonais na qualidade do sêmen

Do ponto de vista do bem-estar animal, o índice de temperatura e umidade (THI) tem sido um dos indicadores mais utilizados para avaliação do nível de conforto térmico animal (Burcu et al., 2024; Llamas-Luceno et al., 2020). A mensuração do THI tem se popularizado nos mais diversos sistemas de produção animal, associando de forma simples e com baixo custo duas variáveis (temperatura e umidade relativa do ar) que influenciam diretamente o conforto térmico animal. De acordo com North et al., (2023) quando o THI ultrapassa valores de 68,8 (em escala que pode chegar até 99 pontos) já se observam efeitos adversos do clima sobre a capacidade de produção animal. Nesse contexto, visando avaliar o efeito do THI sobre a qualidade do sêmen bovino Alves (2024) observou queda significativa na concentração e percentual de células móveis totais em ejaculados de touros Angus e Nelore em função do aumento do THI. No mesmo estudo, aumento significativo no percentual de defeitos espermáticos totais foi observado em ejaculados de touros Angus, não sendo identificado o mesmo efeito para amostras de sêmen de touros Nelore.

Embora interações discretas tenham sido observadas entre o THI e a qualidade do sêmen *in natura* de touros Holandeses criados em clima temperado, Llamas-Luceño et al., (2020) concluíram que a elevação de temperatura e umidade provavelmente exerce maior efeito deletério sobre células que se encontram em fase meiótica durante o processo de espermatogênese, determinando aumento do percentual de defeitos morfológicos e maior sensibilidade ao processo de criopreservação espermática, expressa pela redução significativa da motilidade progressiva pós-descongelamento e pós 3 horas de incubação.

Em recente levantamento do nosso grupo de pesquisa foram avaliados dados de qualidade e produção de sêmen no período de 2020 a 2023 (Botucatu, SP, Brasil) para touros de seis diferentes raças (n= 468 touros): Angus (n=46), Brangus (n=16), Gir Leiteiro (n=16), Girolando (n=25), Holandês (n=40) e Nelore (n=325). Embora tenham sido observadas diferenças (efeito touro, efeito raça) para a qualidade do sêmen ao longo das diferentes estações do ano, a concentração espermática foi um dos parâmetros mais impactados. De forma geral, raças com genética leiteira (Holandês, Girolando e Gir) apresentaram menor produção de células espermáticas durante os meses de primavera e verão, enquanto para touros Brangus

não foram observados impactos da sazonalidade na concentração espermatozoides/ejaculado. Já touros Nelore e Angus apresentaram comportamento antagônico, com os primeiros exibindo diminuição da produção espermática nos meses mais frios do ano, enquanto os animais Angus se beneficiaram dos meses de inverno, exibindo maior concentração espermática/ejaculado.

Torna-se importante ressaltar que mesmo em países de clima temperado, com verões e invernos mais amenos (Arnhem, Holanda), pode-se observar redução significativa na qualidade do sêmen fresco, com diminuição do potencial mitocondrial em amostras espermáticas colhidas nos meses de verão (Van Weezel et al., 2024). Resultados semelhantes também foram reportados em análises de sêmen congelado, onde se observou aumento significativo no percentual de defeitos espermáticos em amostras colhidas nos meses de verão (Awal et al., 2024).

Importante destacar que muitas das alterações espermáticas associadas ao estresse térmico ocorrem em nível estrutural e/ou funcional (por exemplo, influência sobre a protaminação e integridade e grau de condensação do DNA espermático) exigindo, geralmente, a implementação de técnicas fluorescentes para avaliação em citometria de fluxo, que garantem maior acurácia para determinação das alterações celulares.

Estresse Social e de Manejo

Bovinos podem ser classificados como animais gregários. Embora a vida em grupos possa determinar uma série de vantagens adaptativas, ela também resulta em competição por recursos, principalmente quando escassos, desencadeando interações agressivas entre animais do mesmo grupo ou rebanho, que ocorrem para estabelecimento de relações de dominância (Paranhos da Costa e Costa e Silva, 2007).

Embora touros manejados na grande maioria das Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CPPS) sejam alocados em piquetes ou baias individuais, evitando confrontos e disputas por espaço ou área de cocho, a interação (visual, olfativa, contato na seringa que dá acesso aos troncos de contenção) entre os indivíduos muitas vezes se torna inevitável, permitindo também o estabelecimento de dominância e hierarquia entre os animais. Na experiência prática dos autores, touros submissos em situações de estresse por superlotação nas áreas de coleta apresentam redução de libido, maior tempo de refratariedade entre coletas sucessivas (utilizando vagina artificial) e queda na qualidade espermática, expressa por redução na motilidade e concentração dos ejaculados, associado ao aumento dos defeitos espermáticos maiores (com especial destaque para defeitos de cabeça em situações de estresse crônico) e menores (defeitos de cauda e de implantação, com maior relação com quadros de estresse agudo).

De acordo com Schenk (2018) as áreas de coleta devem ser idealizadas para proporcionar conforto (com especial atenção ao tipo de piso no solo), segurança (para os animais e equipe de coleta) e prevenção a distrações (grande fluxo de animais, barulho, circulação de pessoas ou de maquinário, entre outras) que podem impactar negativamente na libido, causando ansiedade e levando a quadros de estresse.

Uma alternativa para redução do estresse em touros criados em sistemas coletivos pode representar as novas formulações tóxicas a base de análogos sintéticos de substância apaziguadora bovina (SAB), molécula produzida naturalmente pelas vacas durante o trabalho de parto. Em recente estudo conduzido na Central Bela Vista (dados não publicados, 2024) animais que receberam formulação comercial de SAB (SecureCattle®, Nutricorp, Brasil) pré-transporte para confinamento em baias coletivas (média de 39 animais por baia, com 4 cochos eletrônicos/baia, permanência de 75 dias) apresentaram maior concentração de espermatozoides/ml de sêmen, além de menor percentual de defeitos menores nos ejaculados ao final do período de confinamento.

Estresse Nutricional

É notória a influência do balanço energético negativo (BEN) ou oferta de dietas desbalanceadas sobre a capacidade reprodutiva de machos e fêmeas bovinas. O BEN pode representar um importante agente estressor, com potencial para diminuição das secreções de IGF-1 e GnRH, com consequente impacto na produção de gonadotrofinas, esteroidogênese, gametogênese e qualidade do sêmen de touros (Fernandez-Novo et al., 2020). No entanto, touros submetidos a regime de CCPS geralmente chegam às Centrais em situação completamente oposta, manifestando excesso de peso alcançado durante a preparação para venda ou participação de leilões, onde é comum a oferta de dietas hipercalóricas promotoras de grandes taxas de ganho de peso como estratégia pré-venda.

Nesse contexto, torna-se importante ressaltar que embora haja necessidade de promover a redução do escore de condição corporal de touros obesos, dietas abruptas (sem período adequado de adaptação) e

muito restritivas são capazes de causar estresse agudo, determinando a queda significativa na qualidade de sêmen. Nesse contexto, na experiência dos autores, dietas muito restritivas tendem a causar diminuição da concentração de espermatozoides por ejaculado, redução nos parâmetros cinéticos, maior proporção de defeitos maiores (sobretudo defeitos de cabeça, com destaque para pouch formation e formação de crateras), além da redução da congelabilidade do sêmen.

Influência do estresse sobre a fertilidade espermática

De maneira geral, todo reprodutor sob estresse apresenta queda no desempenho produtivo (diminuição das taxas de ganho de peso diário, menor conversão alimentar, maior susceptibilidade a doenças) e reprodutivo (influência direta na espermatogênese e qualidade espermática). Embora muitos sejam os fatores desencadeantes de estresse, quase a totalidade dos estudos nessa área possui objetivos centrados no impacto do estresse térmico e capacidade de termorregulação testicular sobre a qualidade do sêmen e fertilidade de machos bovinos.

Durante o estresse térmico testicular se observa a ativação de processos de apoptose responsáveis por dano tecidual e morte celular (Rizzoto et al., 2020). Além disso, processos mitóticos relacionados à espermatogênese e expressão de proteínas específicas relacionadas a formação da cauda e aquisição de movimento pelas células espermáticas são impactados pela elevação da temperatura local (Rizzoto et al., 2024), influenciando a capacidade de produção espermática, a cinética, morfologia e, em última instância, a fertilidade animal.

Nesse contexto, de acordo com Seifi-Jamadi et al. (2020) a queda na qualidade espermática que ocorre em situações de alto THI exerce influência significativa sobre a fertilidade do sêmen bovino em sistemas de produção *in vitro* de embriões, reduzindo as taxas de clivagem, de formação de blastocistos e de eclosão, resultando em menor número de estruturas transferíveis para possíveis receptoras.

Em recente estudo retrospectivo conduzido no Brasil, Alves (2024) observou sazonalidade não apenas para variáveis de qualidade do sêmen bovino fresco e pós-descongelamento, como também diferenças nas taxas de concepção de acordo com raça (Angus e Nelore), período do ano e THI (máximo) no dia da coleta do sêmen. De acordo com a autora, em situações de elevado THI (>84,1) são observadas menores taxas de concepção para doses de sêmen de touros Angus (37,4%, n= 515) em relação a touros Nelore (48,9%, n= 6008 inseminações). No entanto, aumento significativo da taxa de concepção (50,2%, n=2067 inseminações) foi observado para doses de sêmen de touros Angus produzidas em situações climáticas de baixo THI (<76,2) não sendo, no entanto, observado efeito da redução da temperatura e umidade ambiental no dia da coleta e produção do sêmen sobre a fertilidade das doses de touros Nelore utilizadas em programas de IATF (49,4%, n=4096).

Resultados semelhantes também foram reportados por Llamas-Luceño et al., (2020) avaliando touros Holandeses criados em região de clima temperado, onde o aumento dos índices de temperatura e umidade impactaram negativamente a qualidade e fertilidade do sêmen, com maior impacto negativo sobre touros mais velhos/idosos.

Considerações

A forma como o organismo bovino lida com situações estressantes varia em função do genótipo, do próprio temperamento animal, do agente causador do estresse, da intensidade e frequência com que o animal é exposto ao estímulo estressor. No entanto, independente do agente causador do estresse, além da diminuição do desempenho produtivo também se observa a queda da qualidade e fertilidade do sêmen, impactando diretamente a capacidade reprodutiva de machos bovinos.

Referências

- Adamczyk K, Pokorska J, Makulska J, Earley B, Mazurek M. Genetic analysis and evaluation of behavioural traits in cattle. *Livestock Science*, v.154, p.1-12, 2013.
- Alves LA. Influência do índice de temperatura e umidade (itu) ambiental sobre a qualidade e fertilidade de espermatozoides de touros. 2024. 73p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2024.
- Awal IP, Broekhuijse MLWJ, Van Soom A, Rizzoto G. Does sperm selection prevent lasting effects of heat stress exposure in bulls? 27th meeting of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Belgrado, Sérvia, 2024. In: *Annals of the 27th ESDAR*. Resumo aceito.

- Brandão A, Cooke R.** Effects of temperament on the reproduction of beef cattle. *Animals*, v.11, p.1-11, 2021.
- Braz KMG, Monteiro FM, Fernandes LG, Rodrigues NN, Peixoto Jr KC, Green RE, Cortez A, Crespilho AM.** Does bull temperament impact growth performance and semen quality? *Livestock Science*, v.236, p.104038, 2020.
- Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Kastelic JP.** Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology*, v.61, n.2-3, 511-28, 2004.
- Burrow H, Seifert G, Corbet N.** A new technique for measuring temperament in cattle. *Agricultural and Food Sciences*, v.17, p.154-157, 1988.
- Chernenko OM, Prishedko VM, Mylostyvyi RV, Shulzhenko NM, Orishchuk OI, Tsap SV, Khmeleva OV.** Welfare and sperm quality with a focus on stress resistance of *Bos taurus*. *Ukrainian Journal of Ecology*, v.9, p.493-498, 2019.
- Cooke RF, Bohnert DW, Cappelozza BI, Mueller CJ, DelCurto T.** Effects of temperament and acclimation to handling on reproductive performance of *Bos taurus* beef females. *Journal of Animal Science*, v.90, p.3547-3555, 2012.
- Estévez-Moreno LX, la Lama GCM, Villarroel M, García L, Abecia JA, Santolaria P, María GA.** Revisiting cattle temperament in beef cow-calf systems: Insights from farmers' perceptions about an autochthonous breed. *Animals*, v.11, p.1-18, 2021.
- Fordyce G, Goddard ME, Seifert GW.** The measurement of temperament in cattle and the effect of experience and genotype. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, v.14, p.329-332, 1982.
- Fordyce G, Dodt RM, Whythes JR.** Cattle temperaments in extensive beef herds in northern Queensland 1. Factors affecting temperament. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.28, p.683-687, 1988.
- Gibbons JM, Lawrence AB, Haskell MJ.** Consistency of flight speed and response to restraint in a crush in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, v.131, p.15-20, 2011.
- Kasimanickan R, Asay M, Schroeder S, Kasimanickan V, Gay JM, Kastelic JP, Hall JB, Whittier WD.** Calm temperament improves reproductive performance of beef cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, p.1063-1067, 2014.
- Kastelic JP, Wilde RE, Rizzoto G, Thundathil JC.** Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. *Veterinarni Medicina*, v.62, p.437-442, 2017.
- Kastelic JP, Rizzoto G, Thundathil J.** Review: Testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. *Animal*, v.12(s1), p.133-141, 2018.
- Lanier JL, Grandin T, Green RD, Avery D, McGee K.** The relationship between reaction to sudden, intermittent movements and sounds and temperament. *Journal of Animal Science*, v.78, p.1467-1474, 2000.
- Lanier JL, Grandin T.** The relationship between *Bos Taurus* feedlot cattle temperament and cannon bone measurements. *American Society of Animal Science*, v.53, 2002.
- Llamas-Luceño N, Hostens M, Mullaart E, Broekhuijse M, Lonergan P, Van Soom A.** High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility of Holstein bulls in temperate climates. *Journal of Dairy Science*, v.03, n.10, p.9502-9514, 2020.
- Lockwood SA, Kattesh HG, Rhinehart JD, Strickland LG, Krawczel PD, Wilkerson JB, Kirkpatrick FD, Saxton AM.** Relationships among temperament, acute and chronic cortisol and testosterone concentrations, and breeding soundness during performance testing of Angus bulls. *Theriogenology*, v.89, p.140-145, 2017.
- MacKay JRD, Haskell MJ.** Consistent Individual Behavioral Variation: The Difference between Temperament, Personality and Behavioral Syndromes. *Animals*, v.5, p.455-478, 2015.
- Martin LA, Borges MS, Fernandes LG, Silva MO, Landgraf RG, Monteiro FM, Felisbino Neto AR, Crespilho AM.** Temperamento animal pode influenciar qualidade e fertilidade do sêmen de touros Nelore? In: XXIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2021, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2021, p.779. Resumo.
- North MA, Franke JA, Ouweneel B, Trisos CH.** Global risk of heat stress to cattle from climate change. *Environmental Research Letters*, v.18, n.9, p.1-13, 2023.
- Pajor EA, Rushen J, Passillé AMB.** Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Applied Animal Behaviour Science*, v.69, p.89-102, 2000.
- Parham JT, Tanner AE, Wahlberg ML, Grandin T, Lewis RM.** Subjective methods to quantify temperament in beef cattle are insensitive to the number and biases of observers. *Applied Animal Behaviour Science*, v.212, p.30-35, 2019.

- Paranhos da Costa MJR.** Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. In: Encontro Anual de Etologia, 18, 2000, Alfenas. *Anais...* Alfenas: Sociedade Brasileira de Etologia, 2000, p.26-42. Palestra.
- Petherick JC, Doogan VJ, Holroyd RG, Olsson P, Venus BK.** Quality of handling and holding yard environment, and beef cattle temperament: 1. Relationships with flight speed and fear of humans. *Applied Animal Behaviour Science*, v.120, p.18-27, 2009.
- Qiu X, Martin GB, Blache D.** Gene polymorphisms associated with temperament. *Journal of Neurogenetics*, v.31, p.1-16, 2017.
- Rizzoto G, Kastelic JP.** A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants? *Theriogenology*, v.147, p.166-175, 2020.
- Sant'Anna AC, Paranhos da Costa MJR.** Comportamento como indicador do temperamento de bovinos e aplicações na seleção genética. In: Encontro Anual de Etologia, 28, 2010, Alfenas. *Anais...* Alfenas: Sociedade Brasileira de Etologia, 2010, p.88-89. Resumo.
- Shahat AM, Rizzoto G, & Kastelic JP.** Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. *Theriogenology*, v.158, p.84-96, 2020.
- Shahat A, Castillo J, Thundathil J, & Kastelic J.** Angus bulls voluntarily access shade during hot weather, reducing scrotal subcutaneous temperatures and improving sperm quality. *Canadian Journal of Veterinary Medicine*, v.87(1), p.17-22, 2023.
- Smolinger J, Skorjanc, D.** Methods of assessing cattle temperament and factors affecting it: A review. *Agricultura*, v.18, p.23-37, 2021.
- Vetters MDD, Engle TE, Ahola JK, Grandin T.** Comparison of flight speed and exit score as measurements of temperament in beef cattle. *American Society of Animal Science*, v.91, p.374-381, 2013.
- Vedovatto M, Faria FJC, Costa DS, Cooke RF, Sanchez JMD, Moriel P, Coelho RN, Franco GL.** Effects of temperament on body parameters, ovarian structures and inflammatory response in grazing Nellore cows following fixed-time artificial insemination. *Journal of Veterinary Behavior*, v.44, p.50-54, 2021.
- Von Borell E, Hilary D, Prunier A.** Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Hormones and Behavior*, v.52, p.130-138, 2007.
- Zou P, Sun L, Chen Q, Zhang G, Yang W, Zeng Y, Zhou N, Li Y, Liu J, Ao L, Cao J, Yang H.** Social support modifies an association between work stress and semen quality: Results from 384 Chinese male workers. *Journal of Psychosomatic Research*, v.117, p.65-70, 2019.
- Van Wezel R, Gnagnarelli J, Quirino M, Awal IP, Broekhuijse MLWJ, Van Soom A, Rizzoto G.** Mild heat stress impairs post-thaw mitochondrial potential and overall sperm quality in dairy bulls. X ISABR meeting, Fortaleza, CE, 2024. Anais, resumos aceito.
-