UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS CURRALEIRO/PÉ DURO EM BANCO DE GERMOPLASMA

Iván Salamanca Montesinos
Orientador: Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno

GOIÂNIA
2012

IVÁN SALAMANCA MONTESINOS

AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS CURRALEIRO/PÉ DURO EM BANCO DE GERMOPLASMA

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno - Embrapa Cerrados
Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Gustavo Eduardo Freneau - UFG
Prof[a]. Dr[a]. Maria Clorinda Soares Fioravanti - UFG

GOIÂNIA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Salamanca Montesinos, Iván.
S159a Avaliação espermática do sêmen criopreservado de touros Curraleiro/Pé Duro em banco de germoplasma [manuscrito] / Iván Salamanca Montesinos. – 2012.
x, 67 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno; Coorientadores: Prof. Dr. Gustavo Eduardo Freneau, Prof[a]. Dr[a]. Maria Clorinda Soares Fioravanti.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras e tabelas.
Anexos.

1. Curraleiro (Bovino) – Sêmen – Exame. 2. Banco de germoplasma. I. Título.

CDU: 619:636.2

DEDICO:

A minha mãe Lourdes Montesinos

Ao meu pai Carlos Salamanca

Aos meus irmãos Erik e Carlín

AGRADECIMENTOS

Ao programa PEC-PG e o CNPq pela oportunidade de estudar o mestrado no Brasil.

Aos meus orientadores, o Dr. José Robson Bezerra Sereno, a Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti e o Dr. Gustavo Eduardo Freneau, pessoas generosas que me apoiaram desde o primeiro momento desta nova etapa acadêmica. Sobretudo o Dr. Robson, que me permitiu aprender ciência e ao mesmo tempo crescer pessoalmente para me tornar melhor a cada dia.

À Curadoria do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal, à Dra. Margot Alves Nunes Dode, ao José de Oliveira Carvalho e a Embrapa Cenargen, pelo suporte para realizar esta pesquisa. Ao Marcelo Corrêa da Silva, camarada que sempre ajudou com uma mão amiga. Ao Prof. João Mauricio Lucas Gordo, pelas sabias experiências compartilhadas. Aos amigos da Pós-Graduação UFG e Embrapa Cerrados: Reginaldo, Alexei, Sergio, Leonardo, Marcela, Pedro, Renato, Gabriel, Ernane, Juliana, Mariana, Sandra, Lili, Ivete, Prof. Emmanuel, Dr. Carlos Frederico Martins, Dra. Sharon Lisauskas, Luiz Osvaldo, Juaci, Carol, Elisa, Roberta e todos os demais que não mencionei, pelos gratos momentos que passamos juntos.

A minha mãe Lourdes Montesinos e meu pai Carlos Salamanca, pelo seu grande amor e educação fornecidos sempre dentro dos valores cristãos. Aos meus queridos irmãos Erik e Carlín, companheiros de toda a vida, com os quais compartilhei muitos momentos que nunca esquecerei. A minha tia Antonia Salamanca, segunda mãe que sempre cuidou dos seus sobrinhos como se fossem filhos.

A Tiana da Silva, Vilma, Junior, Diego e as pessoas da igreja Batista de Criméia Leste, gente boa que me amparou espiritualmente nos momentos que precisava. À galera da Casa de Estudantes Samambaia, pela convivência de todos os dias.

A Deus e à Virgem Maria por cuidar de mim sempre.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 3
2.1 Aspectos morfológicos e funcionais da célula espermática..... 3
2.2 Criopreservação espermática..... 5
2.3 Avaliação espermática..... 6
2.3.1 Morfologia espermática..... 8
2.3.2 Motilidade espermática..... 9
2.3.3 Integridade da membrana plasmática e do acrossoma..... 10
2.3.4 Taxas de fecundação *in vitro*..... 12
3 OBJETIVOS..... 13
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 14
4.1 Local de realização do Experimento..... 14
4.2 Disponibilização e descongelamento do sêmen Curraleiro/Pé Duro..... 14
4.3 Avaliação dos parâmetros espermáticos..... 15
4.3.1 Avaliação da Morfologia espermática..... 15
4.3.2 Avaliação da Cinética espermática..... 16
4.3.3 Avaliação de Integridade da membrana plasmática e do acrossoma.... 17
4.3.4 Avaliação das Taxas de fecundação *in vitro*..... 19
4.4 Delineamento experimental e Análise estatística..... 21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 22
5.1 Análise descritiva..... 22
5.1.1 Morfologia espermática..... 22
5.1.2 Cinética espermática..... 23
5.1.3 Integridade da membrana plasmática e do acrossoma..... 25
5.1.4 Parâmetros que visam a fertilidade nos exames espermáticos..... 25
5.2 Correlações..... 28
5.3 Análise de Cluster, dendrograma e estatística descritiva dos grupos.... 29
5.3.1 Morfologia espermática..... 30
5.3.2 Cinética espermática..... 31
5.3.3 Integridade da membrana plasmática e do acrossoma..... 32
5.4 Avaliação das Taxas de fecundação *in vitro*..... 34
6 CONCLUSÕES..... 38
REFERÊNCIAS 39
ANEXOS..... 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Trajeto da célula espermática até a formação do embrião.....	4
Figura 2	Descongelamento sêmen Curraleiro/Pé Duro (A, B, C) para posterior análise *in vitro* (D).....	14
Figura 3	Espermatozóides com morfologia anormal: cauda fortemente dobrada com gota (A), gota citoplasmática proximal e crateras (B), formas teratológicas (C).....	15
Figura 4	*Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA).....	16
Figura 5	Espermatozóides corados com C-FDA e IP. Membrana plasmática íntegra (A), lesada (B) e semi-lesada (C).....	18
Figura 6	Espermatozóides visualizados na Microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2). Espermatozóide morto com acrossoma íntegro (A) e espermatozóide morto com acrossoma reagido (B), corados na epifluorescência pela conjugação FITC-PNA-IP. O espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (C) não apresentou coloração FITC-PNA-IP.....	18
Figura 7	Estágios encontrados nos zigotos 18 horas pós FIV: cabeça espermática (A), cabeça descondensada (B) e pronúcleos (C).....	20
Figura 8	Taxas de espermatozóides normais e defeitos maiores em 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	22
Figura 9	Taxas de motilidade progressiva e células rápidas em 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	24
Figura 10	Taxas de integridade da membrana plasmática e do acrossoma em 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	25
Figura 11	Cluster e Dendrograma de 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro, segundo parâmetros que visam a fertilidade nos exames espermáticos realizados.....	29
Figura 12	Motilidade progressiva mensurada pelo CASA e microscopia convencional, das doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro escolhidas para FIV.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros que visam a fertilidade: espermatozóides normais (NRM), defeitos maiores (DMA), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RPD), membrana plasmática íntegra (MPI) e espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI).....	26
Tabela 2	Doses espermáticas com divergências entre os parâmetros que visam a fertilidade.....	27
Tabela 3	Correlações de Pearson dos parâmetros que visam a fertilidade: espermatozóides normais (NRM), defeitos maiores (DMA), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RPD), membrana plasmática íntegra (MPI) e espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI).....	28
Tabela 4	Morfologia espermática dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	30
Tabela 5	Cinética espermática dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	31
Tabela 6	Integridade da membrana plasmática dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	32
Tabela 7	Integridade de acrossoma dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.....	33
Tabela 8	Doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro escolhidas para avaliação das Taxas de fecundação *in vitro*.....	34
Tabela 9	Taxas de fecundação oocitária 18 horas pós inseminação *in vitro*.....	36
Tabela 10	Estágios da cromatina masculina 18 horas pós inseminação *in vitro*.....	37

RESUMO

Esta pesquisa objetivou avaliar a qualidade do sêmen criopreservado de 21 touros Curraleiro/Pé Duro em banco de germoplasma, categorizando as doses dos reprodutores segundo parâmetros espermáticos que buscam a fertilização oocitária, e verificando *in vitro* o potencial fecundante da dose seminal. Todas as amostras foram descongeladas e analisadas pelos exames espermáticos de morfologia, cinética, integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma; no entanto, só quatro delas também foram avaliadas através das taxas de fecundação, devido ao maior número de palhetas estocadas, as quais permitiram testar mais de um ensaio *in vitro*. Contaram-se aproximadamente 200 espermatozóides para cada exame, os resultados foram expressos em porcentagens e submetidos a estatística descritiva simples (média e desvio padrão), utilizando como referência comparativa, os padrões sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para sêmen descongelado bovino, assim como valores obtidos em outras pesquisas. Os resultados dos quatro exames espermáticos foram verificados, e buscaram-se os parâmetros mais importantes que visam a fertilidade, sendo na morfologia a taxa de espermatozóides normais (NRM) e defeitos maiores (DMA); na cinética, a motilidade progressiva (MP) e células rápidas (RPD); na integridade da membrana plasmática, a membrana plasmática íntegra (MPI) e na integridade do acrossoma, o espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI). Das 21 doses analisadas, dez apresentaram valores adversos nos parâmetros espermáticos mencionados, e dessas amostras, sete mostraram divergências, porque tinham resultados negativos para a fecundação em alguns exames e resultados favoráveis em outros, revelando a complexa natureza do espermatozóide. Tomaram-se em conta para as correlações de Pearson, análise de Cluster e elaboração de um dendrograma, os parâmetros NRM, DMA, MP, RPD, MPI e EVAI. O Cluster criou por similaridade espermática três grupos (G1, G2 e G3), para morfologia, cinética, integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma. Os resultados foram avaliados mediante estatística descritiva simples, e a diferença das médias pelos testes de Duncan e Kruskal Wallis, ao nível de significância de 5%. Vale salientar que no dendrograma a DT10 e DT19 foram discriminadas dos grupos por ter valores muito distantes do resto das doses seminais. Na avaliação das taxas de fecundação, foram feitas três réplicas com as palhetas dos quatro touros escolhidos, passando previamente através do gradiente Percoll (45:90%), para eliminar as células defeituosas e melhorar a capacidade fecundante. Esta seleção permitiu resultados favoráveis, com taxas de oócitos fertilizados superiores a 60%. Na avaliação da cromatina masculina 18 horas pós inseminação *in vitro* foram observadas altas taxas para Pronúcleo. A diferença estatística destes valores foi estimada pelo teste Chi-quadrado. Os resultados revelaram a qualidade espermática e capacidade fecundante *in vitro* do sêmen Curraleiro/Pé Duro analisado, possibilitando delinear adequadas estratégias, para a conservação deste recurso genético local em extinção, possuidor de características únicas de adaptação e rusticidade, que poderiam ser inseridas futuramente nos rebanhos bovinos brasileiros.

Palavras-chave: conservação, raças locais, recursos genéticos animais

ABSTRACT

This investigation aimed to evaluate the quality of cryopreserved semen from 21 Curraleiro/Pé Duro bulls in germplasm bank, categorizing the doses of the sires according to spermatic parameters that search the oocitary fertilization, and verifying *in vitro* the fecundant potential of the seminal dose. All the samples were thawed and analyzed by the spermatic exams of morphology, kinetics, integrity of plasmatic membrane and integrity of acrosome; however, only four of them also were evaluated through the fertilization rates, due to the major number of stocked straws, which allowed to test more than one *in vitro* essay. Approximately 200 spermatozoids were counted for each exam, the results were expressed in percentages and submitted to simple descriptive statistics (mean and standard deviation), using as comparative reference, the patterns suggested by the Brazilian Animal Reproduction College for bovine thawed semen, as well as values obtained in other investigations. The results of the four spermatic exams were verified, and were searched the most important parameters that aim the fertility, being in the morphology the rate of normal spermatozoids (NRM) and major defects (DMA); in the kinetics, the progressive motility (MP) and rapid cells (RPD); in the integrity of plasmatic membrane, the whole plasmatic membrane (MPI); and in the integrity of acrosome, the live spermatozoid with whole acrosome (EVAI). From the 21 analyzed doses, ten presented adverse values in the mentioned spermatic parameters, and of these samples, seven showed divergences, because they had negative results for fertilization in some exams and favorable results in others, revealing the complex nature of the spermatozoid. Were taken into account for Pearson correlations, Cluster analysis and a dendrogram elaboration, the parameters NRM, DMA, MP, RPD, MPI and EVAI. The Cluster created by spermatic similarity three groups (G1, G2 e G3), for morphology, kinetics, integrity of plasmatic membrane and integrity of acrosome. The results were evaluated through simple descriptive statistics, and the difference of means by Duncan and Kruskal Wallis tests, at 5% significance level. It is worth mentioning that in the dendrogram the DT10 and DT19 were discriminated from the groups for having very distant values from the rest of seminal doses. In fecundation rates evaluation, three replicates were made with the straws of the four chosen bulls, passing previously through Percoll gradient (45:90%), for eliminating the defective cells and improving the fertilizing capacity. This selection allowed favorable results, with rates of fertilized oocytes superior to 60%. In the evaluation of masculine chromatin 18 hours post *in vitro* insemination high Pronucleus rates were observed. The statistical difference of these values was estimated by Chi-square test. The results revealed the spermatic quality and *in vitro* fecundant capacity of Curraleiro/Pé Duro analyzed semen, enabling to delineate appropriate strategies, for the conservation of this local genetic resource in extinction, owner of unique characteristics of adaptation and rusticity, that could be included hereafter in the brazilian cattle herds.

Keywords: animal genetic resources, conservation, local breeds

1 INTRODUÇÃO

O Curraleiro, também chamado Pé Duro, é uma raça local brasileira, originária dos bovinos trazidos pelos colonizadores europeus no século XVI, descendente do tronco *Bos taurus ibericus* (MARIANTE & EGITO, 2002). Trata-se de uma raça secular, como também são o Caracú, Pantaneiro e Crioulo Lageano. Esses bovinos foram povoando os campos, à medida que os territórios do novo continente eram explorados, sendo submetidos a constante seleção natural e adaptação por mais de 400 anos, representando um verdadeiro tesouro genético para a pecuária tropical brasileira. Apesar de não apresentarem níveis superiores de produção, são rústicos, resistentes ao calor, doenças e parasitas, além de aproveitar de forma eficiente pastos de baixa qualidade (MARIANTE et al., 2009).

Segundo MARIANTE & EGITO (2002), no final do século XIX e começo do XX, no Brasil começaram-se a importar raças especializadas, com maior desempenho zootécnico que os bovinos locais, sendo o Curraleiro/Pé Duro substituído mediante cruzamentos absorventes e descartado dos rebanhos, fato que provocou a diminuição de animais puros e assim da variabilidade genética, o que quase causou seu desaparecimento. Graças a esforços da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em especial das unidades descentralizadas Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Meio Norte, em parceria com associações de criadores, universidades e outras instituições, tem se iniciado ações de conservação do gado Curraleiro/Pé Duro, encontrando ainda rebanhos em regiões do Centro Oeste e Nordeste brasileiro. No último censo em 2008, registraram-se 3.692 animais desta raça, distribuídos entre os estados de Pará, Piauí, Tocantins e Goiás (FIORAVANTI et al., 2011).

No campo da conservação existem basicamente duas estratégias para preservar as espécies ameaçadas, sendo uma a conservação *in situ*, onde os animais são mantidos em ambientes naturais ou artificiais, e a conservação *ex situ*, criopreservando em banco de germoplasma os embriões, espermatozóides, oócitos, entre outras células, como fonte de multiplicação, regeneração e distribuição de uma população animal em extinção (MARIANTE & EGITO, 2002). Estas ações são executadas desde 1983 pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em beneficio das raças crioulas brasileiras (TEIXEIRA et al., 2008).

Segundo DODE & RUMPF (2002), muitas biotecnologias reprodutivas estão sendo utilizadas na conservação e regeneração das espécies animais. Entre elas destacam pesquisas de laboratório com os gametas masculinos e femininos, onde a avaliação da qualidade espermática é de grande interesse para desenvolvimento de metodologias que permitam o rápido diagnóstico do potencial fertilizante dos reprodutores, buscando assim uma efetiva replicação da espécie. Sendo essa avaliação realizada antes que os touros sejam utilizados na monta natural a campo, ou prévio à produção de palhetas para inseminação artificial.

É importante aprofundar maiores estudos no gado Curraleiro/Pé Duro, já que até o momento só temos trabalhos referentes a censo populacional, programas de conservação e caracterização dos criatórios (CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 2001; FIORAVANTI et al., 2008; FIORAVANTI et al., 2011; MOURA et al., 2011; NEIVA et al., 2011; SALLES et al., 2011), adaptação ao calor (BIANCHINI et al., 2006; AZEVEDO et al., 2008), sanidade (COELHO et al., 2004; PAIVA NETO, 2004; JULIANO, 2006; BARINI, 2007; JULIANO et al., 2007; SANTIN, 2008; JULIANO et al., 2009; LOBO, 2009; MORAES et al., 2009; GUIMARÃES, 2011), qualidade da carne (COSTA et al., 2011), genômica e proteômica (EGITO et al., 2004; RANGEL et al., 2004; SERRANO et al., 2004; EGITO et al., 2005; SERRANO et al., 2005; ALMEIDA, 2008; ISSA et al., 2008; ISSA et al., 2009; EGITO et al., 2011; MENEZES et al., 2011), fenótipo (BARBOSA et al., 2004), características andrológicas (BRITTO, 1987; BRITTO & MELLO, 1988; SOUSA et al., 2004; PEZZINI et al., 2006; RAMOS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009; MONTESINOS et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011; SALLES et al., 2012), tratamentos hormonais e embriões (TEIXEIRA, 2009). Para assegurar o futuro do gado Curraleiro/Pé Duro recomenda-se elaborar mais pesquisas enfocando parâmetros reprodutivos tanto de machos como fêmeas, por serem de grande importância para viabilizar sua multiplicação nos núcleos de criação, e conservação em bancos de germoplasma.

A extinção deste bovino crioulo brasileiro seria uma perda irreparável para a ciência, pois com ele desapareceriam inúmeras informações contidas na sua estrutura genética, desenvolvidas ao longo dos séculos pela seleção natural (MARIANTE & CAVALCANTE, 2006), que a futuro podem ser úteis em programas de melhoramento genético e cruzamento industrial (CARVALHO, 1999).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos morfológicos e funcionais da célula espermática

O espermatozóide é uma célula formada nos túbulos seminíferos dos testículos, a partir da divisão e transformação das células germinais (espermatogônias) em um processo chamado espermatogênese (MRUK & CHENG, 2004). Segundo JOHNSON et al. (2000), a espermatogênese consta das seguintes fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. Nos touros estas fases duram 21, 23 e 17 dias respectivamente, somando em total 61 dias. Na primeira fase, a espermatogônia mediante mitose se divide sucessivamente, visando sua proliferação e subsistência, convertendo-se em espermatócito. A partir da segunda fase, o espermatócito iniciará meiose, sendo o material genético duplicado e recombinado, acontecendo duas divisões celulares que produzirão a espermátide. Na terceira fase, a espermátide sofrerá mudanças estruturais para se tornar espermatozóide. Estas mudanças incluem a formação do acrossoma e cauda, condensação cromossômica e remoção do excessivo conteúdo citoplasmático (ZHOU & GRISWOLD, 2008), que na forma de gota desaparecerá durante a passagem do espermatozóide pelo epidídimo, local onde acontecerá a maturação final (DACHEUX et al., 2005).

Os espermatozóides dos mamíferos possuem a mesma estrutura básica de cabeça e cauda. A cabeça possui duas regiões importantes, o núcleo e acrossoma. A cauda está constituída pela peça intermediária e peça principal (flagelo). A célula inteira é coberta pela membrana plasmática e também possui outras membranas que envolvem estruturas, como o núcleo (membrana nuclear), acrossoma (membrana acrossomal interna e externa) e mitocôndrias (membrana mitocondrial). A função do núcleo é levar a carga genética (DNA), o acrossoma contém enzimas hidrolíticas (hialuronidase e acrosina) que penetram a zona pelúcida do oócito, a peça intermediária possui mitocôndrias produtoras de energia, o flagelo proporciona motilidade para o deslocamento ao longo do trato reprodutivo feminino, e as membranas espermáticas protegem a célula e fornecem equilíbrio osmótico (MORTIMER, 1997; FLESCH & GADELLA, 2000).

Na monta natural o touro ejacula cerca de 15 bilhões de espermatozóides na vagina da fêmea, sendo que na inseminação artificial (IA) utiliza-se uma quantidade aproximada de 10 milhões, os quais serão depositados na entrada do corpo uterino (AMANN, 1989).

Durante o trajeto espermático através do trato reprodutivo feminino ocorre a capacitação celular, que provoca modificações responsáveis pela habilidade de ligação à zona pelúcida (ZP) do oócito (RATH et al., 2005). FLESCH & GADELLA (2000) relataram que na ZP acontecerá a reação acrossômica por liberação das enzimas hidrolíticas, e também ênfase na hiperativação da motilidade, sendo que ambas possibilitarão a entrada espermática no gameta feminino com conseqüente fecundação e formação do embrião (Figura 1).

Na fecundação o DNA do espermatozóide é descondensado, formando o pronúcleo masculino que se liga ao pronúcleo feminino do oócito, dando origem ao novo individuo (MCLAY & CLARKE, 2003).

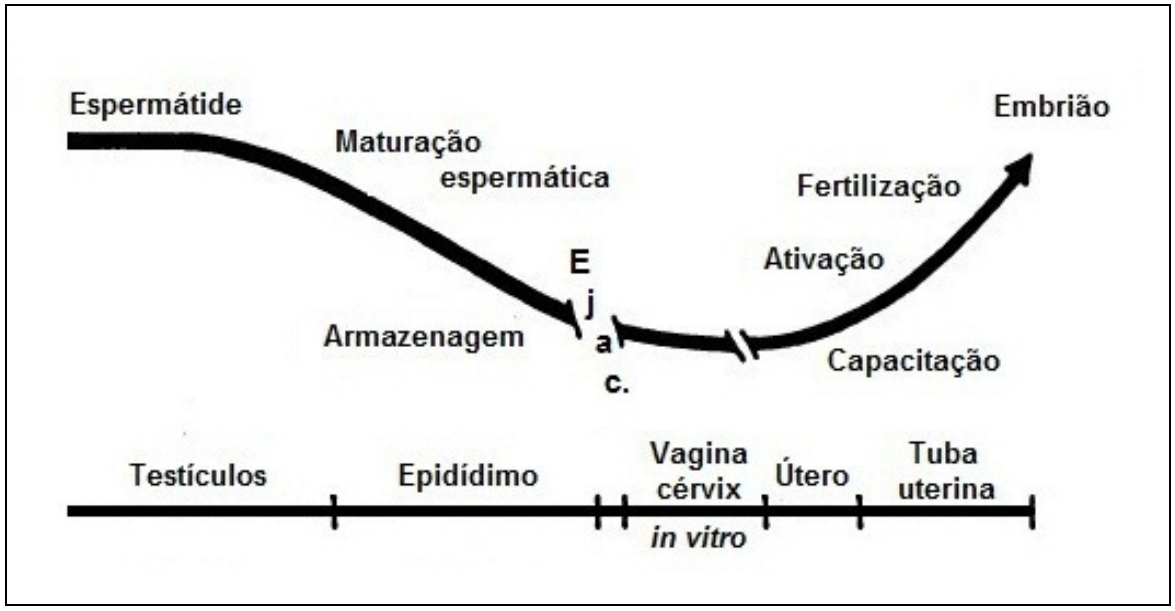

FIGURA 1 - Trajeto da célula espermática até a formação do embrião
Fonte: Adaptado de AMANN (1989)

2.2 Criopreservação espermática

Nas biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIVE), entre outras, o ejaculado dos touros não é depositado de forma natural no trato reprodutivo feminino, este passa por um processo inicial de coleta, por meio de vagina artificial ou eletroejaculador, sendo posteriormente utilizado, ou criopreservado.

Na criopreservação este material se converterá em um banco de germoplasma, para uso comercial na produção de animais superiores, ou na conservação *ex situ* dos recursos genéticos em perigo de extinção (HOLT, 1997). Sabe-se que a criopreservação procura suspender o metabolismo espermático e manter as características celulares por um período prolongado (YOSHIDA, 2000). Segundo HAMMERSTEDT et al. (1990) a técnica consta de cinco etapas: refrigeração, adição de crioprotetores e embalagem, congelação, armazenamento e descongelação. Após estas etapas, a célula espermática deve apresentar atributos de boa integridade e funcionalidade para conseguir a fecundação, tais como: metabolismo mitocondrial (produção de energia), motilidade flagelar (passagem ao longo do trato reprodutivo feminino), integridade nuclear (armazenagem do DNA), enzimas acrossomais (penetração da ZP do oócito) e integridade da superfície equatorial da cabeça (união do gameta masculino e feminino).

JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS (2002) relataram que a maior desvantagem da criopreservação é o dano causado aos espermatozóides pelos procedimentos da técnica, sendo que 50% de uma amostra sobrevivem, mas podem apresentar danos nas membranas espermáticas, citoesqueleto e núcleo, assim como alteração na motilidade e metabolismo celular. Estas situações após descongelamento fazem com que a célula espermática fique muito mais sensível a qualquer estresse. Conforme MEDEIROS et al. (2002) a criopreservação reduz o tempo de vida útil do espermatozóide, sua habilidade para interagir no trato reprodutivo feminino e fertilidade. WATSON (2000) indica resultados desfavoráveis na motilidade para uma amostra descongelada, em comparação ao sêmen fresco.

As principais causas dos danos espermáticos são: choque térmico, formação de cristais e desidratação. Visando minimizar os danos e evitar a redução da capacidade fecundante do espermatozóide se busca a interação entre composição do plasma seminal, diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento, congelação e descongelação (YOSHIDA, 2000; AMIRAT et al., 2004; CASTELO et al., 2008; BARBAS & MASCARENHAS, 2009). Sabe-se que os danos celulares acontecem em qualquer etapa da criopreservação (CELEGHINI, 2005) e que a sobrevivência espermática requer de diferentes avaliações *in vitro*, que revelem as lesões ocorridas nos compartimentos celulares (HAMMERSTEDT et al., 1990).

2.3 Avaliação espermática

No século XX muitos cientistas começaram a pesquisar as relações entre os parâmetros seminais e a fertilidade. Entretanto a variabilidade destes parâmetros deve ser bem entendida antes de aprofundar em outros contextos (WIJCHMAN et al., 2001). Conforme AMANN & HAMMERSTEDT (1993), a avaliação da qualidade espermática está relacionada com a predição do potencial de fertilidade de um ejaculado, que depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares para a máxima produção de descendentes por reprodutor.

GRAHAM & MOCÉ (2005) relataram que muitas técnicas têm sido desenvolvidas na busca da mensuração desta característica reprodutiva dos machos, mas o objetivo ainda não foi conseguido em decorrência de fatores como a complexa natureza do espermatozóide, o conceito de fertilidade, a habilidade dos técnicos em avaliar as amostras e o adequado manejo das fêmeas a serem acasaladas ou inseminadas. O conceito de fertilidade pode ser descrito como a taxa de fêmeas nas quais seus embriões são coletados após IA; a taxa de fêmeas prenhes em determinado número de dias após IA única ou múltipla, durante um ciclo estral ou vários ciclos estrais; e a taxa de fêmeas paridas após IA.

No ejaculado dos mamíferos coexistem diferentes sub-populações de espermatozóides. Fato atribuído à diferença na sua origem, fatores genéticos, doenças, estresse, medicamentos e anormalidades reprodutivas, assim como

diferentes estados de maturação e idade quando se combinam no epidídimo (GILLAN et al., 2008). Esta heterogeneidade espermática se reflete em diferenças na morfologia, motilidade, viabilidade e ultimamente na capacidade fecundante do espermatozóide (KATHIRAVAN et al., 2011).

AMANN (1989) indica que além das diferenças espermáticas encontradas entre reprodutores, existem diferenças entre ejaculados do mesmo macho, já que cada um deles está composto por populações heterogêneas de espermatozóides. Esta heterogeneidade espermática passará por seleção através das barreiras naturais do trato reprodutivo feminino, reduzindo uma população de milhões a uns poucos espermatozóides competentes (MUIÑO et al., 2008).

Na rotina de laboratório, os exames espermáticos *in vitro* destacam-se por serem ferramentas de grande auxílio nas avaliações andrológicas. Vale salientar que estes exames espermáticos isoladamente não predizem por completo o potencial reprodutivo das amostras, já que os espermatozóides possuem diferentes atributos para fertilizar o oócito, sendo necessária a combinação de diferentes ensaios *in vitro* (GRAHAM et al., 1990). Usualmente se utilizam os parâmetros clássicos de motilidade, morfologia e concentração espermática, que são avaliados sob microscopia ótica e hematocitômetro, mas existem estudos que reportam imprecisão nestes exames manuais, devido à influência de diversos fatores como sua natureza subjetiva, variabilidade entre avaliadores e padrões de análise (VERSTEGEN et al., 2002). PETRUNKINA et al. (2005) relataram que é inadequado basear a predição da fertilidade exclusivamente nestes exames, indicando que surgiram outros que avaliam características funcionais da célula (ex. capacitação, reação acrossômica). Também se aplicam testes, como a fecundação *in vitro* que mensura simultaneamente diferentes características espermáticas (GILLAN et al., 2008).

Nas últimas décadas novas técnicas de caráter objetivo têm sido difundidas para predizer em conjunto e com maior confiabilidade a fertilidade dos reprodutores, entre estas destacam as análises computadorizadas e as sondas fluorescentes. Além disso, estão sendo desenvolvidas pesquisas no campo da bioquímica analítica, chamadas de revolução “ômica”, onde se estudam os genes (genômica), transcrições (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabolitos (metabolômica) do ejaculado (ARRUDA et al., 2004; ARRUDA et al., 2011).

2.3.1 Morfologia espermática

A morfologia espermática permite identificar os reprodutores com defeitos nos espermatozóides. É um método subjetivo na predição da fertilidade, já que a célula espermática possui ultraestruturas que necessitam outros testes para serem analisadas completamente (GRAHAM & MOCÉ, 2005). A morfologia pode ser avaliada em esfregaços corados ou em preparação úmida, e visualizada sob microscopia óptica de contraste de fase ou interferência diferencial, sendo o método da preparação úmida o mais utilizado convencionalmente.

FRENEAU (2011) relatou que muitos sistemas de classificação para as anormalidades espermáticas foram propostos. LAGERLOF (1934) foi um dos pioneiros classificando as anomalias segundo origem em: primárias, secundárias e terciárias. Primárias quando se originam no epitélio seminífero durante espermatogênese. Secundárias quando são originadas fora do epitélio seminífero nas vias intra e extra-testiculares, durante armazenamento e ejaculação. Terciárias quando se originam por manipulação espermática após coleta. BLOM (1973) elaborou uma classificação das anormalidades segundo seu impacto na fertilidade, em defeitos maiores e menores. CHACÓN (2001) indicou que a *Society for Theriogenology* propôs a utilização do sistema que considera como mínimo 70% de espermatozóides normais em uma amostra seminal, percentual que também é sugerido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, CBRA (1998).

SAACKE et al. (1998), SAACKE et al. (2000) e SAACKE (2008) descreveram a classificação morfológica segundo características importantes para a concepção, em defeitos compensáveis e não compensáveis. Os defeitos compensáveis interferem no trânsito espermático (ex. caudas anormais, gota citoplasmática) através trato reprodutivo feminino, impedindo a chegada no istmo e fertilização oocitária, mas com aumento da dose seminal células competentes atenuarão o problema. Não compensáveis são os defeitos que não interferem na hidrodinâmica espermática (diadema, cratera, cabeça piriforme) permitindo competir pela fertilização e inclusive ligar a ZP oocitária, mas devido a aberrações na cromatina masculina existirá incompetência na fertilização ou embriogênese, causando subfertilidade no reprodutor.

FRENEAU (2011) relata uma possível associação entre os defeitos morfológicos da cabeça com características seminais incompensáveis. Cabeças ligeiramente deformes (delgada, curta ou pequena) teriam supostos danos na cromatina, situação que se for comprovada mudaria sua atual classificação no CBRA (1998), onde se consideram defeitos menores.

A morfologia espermática reflete a saúde dos túbulos seminíferos e epidídimo, podendo ser influenciada pelas altas temperaturas, grupo genético e agentes estressores (KUMI-DIAKA et al., 1981; FRENEAU et al., 2010). A idade do reprodutor também interfere na morfologia espermática do ejaculado (KUMI-DIAKA et al., 1981; AL-MAKHZOOMI et al., 2008), assim como a endogamia que incrementa a freqüência de espermatozóides anormais (VERSTEGEN et al., 2002). O manejo deficiente durante a criopreservação pode induzir danos irreversíveis na morfologia da cauda e acrossoma (GRAHAM & MOCÉ, 2005). Amostras seminais com elevadas taxas de espermatozóides defeituosos correlacionam com subfertilidade e infertilidade (SAACKE et al., 1998).

2.3.2 Motilidade espermática

A motilidade expressa viabilidade e integridade do espermatozóide (VERSTEGEN et al., 2002). A motilidade progressiva é necessária para penetrar o muco cervical e atravessar o trato reprodutivo feminino, enquanto a velocidade fornece boa penetração da ZP do oócito (OLDS-CLARKE, 1996). A estimativa da motilidade espermática por microscopia óptica convencional é o ensaio mais comum, mas sofre variações (30% a 60%) por ser um exame subjetivo, perdendo confiabilidade na resposta (VERSTEGEN et al., 2002).

Os erros são reduzidos utilizando o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), que permite exames objetivos, com maior rapidez, precisão e repetibilidade, determinando não somente a porcentagem de células móveis nas amostras, já que também quantifica características específicas da cinética espermática (WIJCHMAN et al., 2001). O CASA fornece informação do estado fisiológico do espermatozóide, com maior acurácia na predição da fertilidade em comparação à avaliação microscópica convencional (FARREL et al., 1998).

Parâmetros mensurados pelo CASA: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de batimento da cabeça (ALH), freqüência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e células rápidas (RPD). Os parâmetros complementares à motilidade são úteis para identificar a capacidade de penetrar muco cervical, atravessar o trato reprodutivo feminino e detectar hiperatividade (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

O CASA também apresenta alguns erros potenciais na mensuração, estes incluem identificação de fragmentos celulares como espermatozóides, o reconhecimento de espermatozóides aglutinados como um único espermatozóide e a fusão da trajetória de dois espermatozóides após colisão (MORTIMER, 1997). Além disso, deve-se considerar que nos espermatozóides criopreservados a estimativa da viabilidade só pela motilidade seria insuficiente, já que se subestimariam os danos causados às membranas celulares, os quais afetam a capacidade espermática de fecundação (MAXWELL & WATSON, 1996).

2.3.3 Integridade da membrana plasmática e do acrossoma

Nas últimas décadas diversos métodos utilizando sondas fluorescentes têm sido descritos na avaliação da integridade e funcionalidade dos compartimentos específicos da célula espermática, os quais estão delimitados por membranas celulares, tais como: membrana plasmática, membrana acrossomal e membrana mitocondrial (GRAHAM et al., 1990; CELEGHINI et al., 2007).

Estas sondas fluorescentes são utilizadas individualmente ou em combinação, e observadas sob microscópio de epifluorescência ou citômetro de fluxo. Se a membrana plasmática do espermatozóide após fluorescência mostra não estar funcionalmente intacta, a célula é considerada deteriorada, já que perde o equilíbrio osmótico e homeostase, o que provoca posteriormente a morte. A integridade da membrana plasmática é importante para que o espermatozóide possa sobreviver tanto no trato reprodutivo feminino, mantendo sua capacidade fecundante *in vivo*, assim como em meios de fecundação nos ensaios *in vitro* (GRAHAM et al., 1990; FLESH & GADELLA, 2000; SILVA & GADELLA, 2006).

AMANN (1989) relatou que a membrana plasmática atua na fusão com a membrana acrossomal externa durante a reação acrossômica e na fusão do espermatozóide com o oócito. GRAHAM & MOCE (2005) definiram a integridade da membrana plasmática como viabilidade espermática.

GARNER et al. (1986) indicaram a combinação das sondas fluorescentes diacetato 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP) como ferramentas na avaliação da membrana plasmática nos mamíferos. O IP atravessa a membrana lesada e possui afinidade pelo DNA, corando em vermelho o núcleo celular. O C-FDA penetra a membrana plasmática e no interior da célula se hidrolisa pelas esterases, produzindo 6 carboxifluoresceína, que será retida pela membrana intacta, exibindo uma fluorescência verde.

Existem também outras sondas fluorescentes utilizadas para avaliar a integridade da membrana plasmática, tais como: Hoechst 33258 (CASEY et al., 1993), Hoechst 33342, Merocianina 540, Yo-Pro 1, (HALLAP et al., 2006), SYBR-14 (THOMAS et al., 1998).

O acrossoma espermático contém enzimas hidrolíticas, liberadas na reação acrossômica, permitindo assim a penetração da ZP e fusão com a membrana plasmática do oócito. Dessa maneira comprova-se a importância da integridade do acrossoma para a fertilização (FLESH & GADELLA, 2000). Essa integridade pode ser verificada por diferentes métodos de fluorescência, entre os quais se destacam as lecitinas, como a aglutinina *Arachis Hypogea* (PNA) e *Pisum sativum* (PSA), reagentes que precisam de pouco tempo para sua ligação com as glicoproteínas da membrana acrossomal externa ou com os componentes enzimáticos da matriz acrossômica. Estas lecitinas devem estar conjugadas a uma sonda fluorescente como o isoticianato de fluoresceína (FITC). O acrossoma intacto não permite sua penetração, enquanto o acrossoma lesado ou reagido permite a penetração e cora de verde amarelado (CROSS & MEIZEL, 1989).

Além das lecitinas existem outras técnicas de fluorescência como Lyso Tracker Green DND-26 (THOMAS et al., 1998) e os anticorpos das enzimas acrossomais (CROSS & MEIZEL, 1989).

2.3.4 Taxas de fecundação *in vitro*

A Fecundação *in vitro* é parte da produção *in vitro* de embriões (PIVE), técnica que potencializa a multiplicação de animais superiores, e com seu estabelecimento outras biotecnologias reprodutivas podem ser aprimoradas e utilizadas. Segundo THIBIER (2005) a PIVE pertence à terceira geração das biotecnologias reprodutivas, após inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE). A PIVE envolve: obtenção, maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos, assim como cultivo *in vitro* dos zigotos e embriões (CIV). Os oócitos podem ser obtidos a partir de ovários de abatedouro ou punção folicular transvaginal em fêmeas doadoras (DODE & RUMPF, 2002). No Brasil em 1994 por meio da PIVE, a Embrapa obteve o primeiro bezerro puro de origem da raça Nelore (RUBIN, 2005).

Durante os últimos anos a FIV tem sido utilizada para propósitos de aplicação tanto na prática como na pesquisa. Na aplicação pratica atua na geração de embriões que serão transferidos a fêmeas receptoras para produção de bezerros, enquanto na pesquisa é desenvolvida para estudar os diferentes estágios do processo de fecundação *in vitro*, o que também permite mensurar o potencial fertilizante dos reprodutores (TANGUE et al., 2002).

Sabe-se que existem diferenças individuais entre touros (efeito macho) e também dentro de cada ejaculado do mesmo animal, isto é refletido nas taxas de fecundação *in vivo* e *in vitro*, assim como no desenvolvimento embrionário (PALMA & SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2008).

A zona intacta do oócito serve para testar todos os passos da penetração espermática e desenvolvimento do posterior zigoto (MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990). Segundo TANGUE et al. (2002), touros com resultados de FIV superiores a 60% são considerados aceitáveis, possibilitando seu uso em posteriores ensaios de fecundação.

Deve-se levar em consideração que reprodutores férteis não necessariamente conseguem altas taxas de fecundação *in vitro*, sendo importante mensurar outros parâmetros da qualidade espermática para obter maior acurácia na predição da fertilidade (DEN DAAS, 1997).

3 OBJETIVOS

- Avaliar a qualidade espermática do sêmen criopreservado de 21 touros Curraleiro/Pé Duro quanto à morfologia, cinética, integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma.

- Categorizar as doses avaliadas dos 21 touros Curraleiro/Pé Duro, criando grupos segundo os parâmetros espermáticos mais importantes que visam fertilidade.

- Avaliar o potencial fertilizante *in vitro* do sêmen criopreservado de quatro touros Curraleiro/Pé Duro, por meio das taxas de fecundação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do Experimento

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), localizado no Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte, Brasília (DF).

4.2 Disponibilização e descongelamento do sêmen Curraleiro/Pé Duro

O material genético foi cedido pela Curadoria do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), que disponibilizou palhetas de sêmen de 21 touros Curraleiro/Pé Duro, oriundos dos estados de Piauí, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal. Para avaliação espermática descongelaram-se as palhetas em banho Maria (37ºC) sendo mergulhadas por 30 segundos. Uma vez descongelado o sêmen foi depositado em um tubo para posterior análise *in vitro* (Figura 2).

FIGURA 2 - Descongelamento sêmen Curraleiro/Pé Duro (A, B, C) para posterior análise *in vitro* (D)

4.3 Avaliação dos parâmetros espermáticos

4.3.1 Avaliação da Morfologia espermática

As amostras de sêmen foram avaliadas em preparação úmida, no microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200) sob imersão e aumento de 1000x (BARTH & OKO, 1989). Diluiu-se uma amostra de sêmen (30 µL) em solução de formol salina a 1,6% (500 µL). Após diluição, uma alíquota de 10 µL foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula para posterior análise. Foram consideradas anormalidades da cabeça e cauda (peça intermediária e peça principal), em um número aproximado de 200 células.

Os resultados obtidos foram expressos em porcentagens de espermatozóides normais e anormais (Figura 3), sendo classificados segundo os padrões sugeridos pelo CBRA (1998), para defeitos totais e maiores em uma amostra seminal. Também foram tomadas em conta as anormalidades morfológicas individuais, que segundo FRENEAU (2011) recomenda-se um limite de 5% quando se trata de defeitos maiores, e 10% quando são defeitos menores.

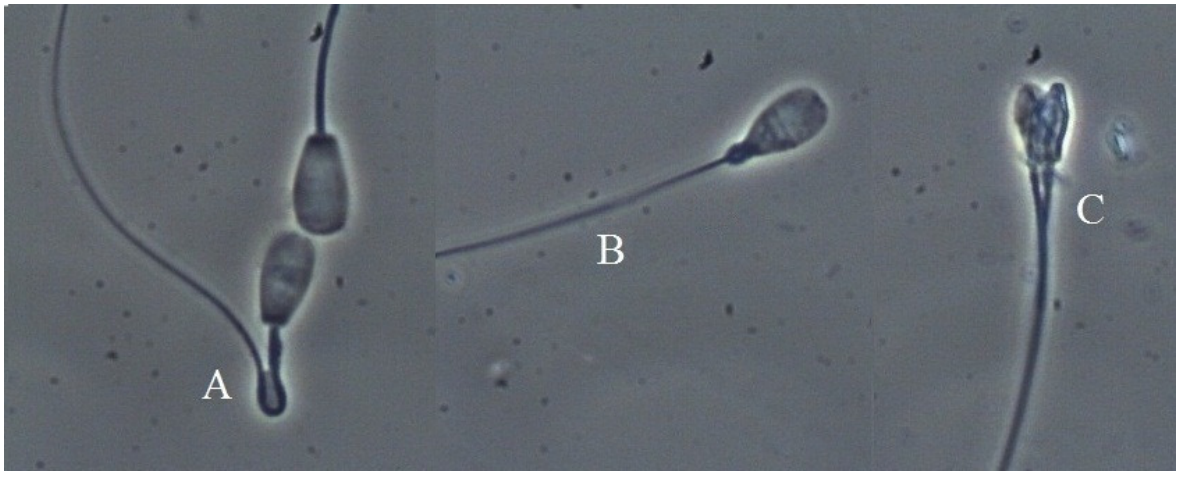

FIGURA 3 - Espermatozóides com morfologia anormal: cauda fortemente dobrada com gota (A), gota citoplasmática proximal e crateras (B), formas teratológicas (C)

4.3.2 Avaliação da Cinética espermática

A cinética espermática foi avaliada pelo *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), modelo IVOS Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences (Figura 4), previamente ajustado (*setup*) para análise de sêmen bovino.

Colocou-se uma alíquota de sêmen (10 µL) na câmara de Makler e se selecionaram três campos de leitura. Os parâmetros examinados foram: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, µm/s); velocidade retilínea (VSL, µm/s); velocidade curvilinear (VCL, µm/s); amplitude lateral de cabeça (ALH, µm); freqüência de batimentos (BCF, Hz); retilinearidade (STR, %); linearidade (LIN, %) e células rápidas (RPD, %).

Foram consideradas a MP e RPD, como os parâmetros mais importantes que visam a fertilidade e revelam resistência à criopreservação, quando apresentam percentuais elevados (KATHIRAVAN et al., 2011).

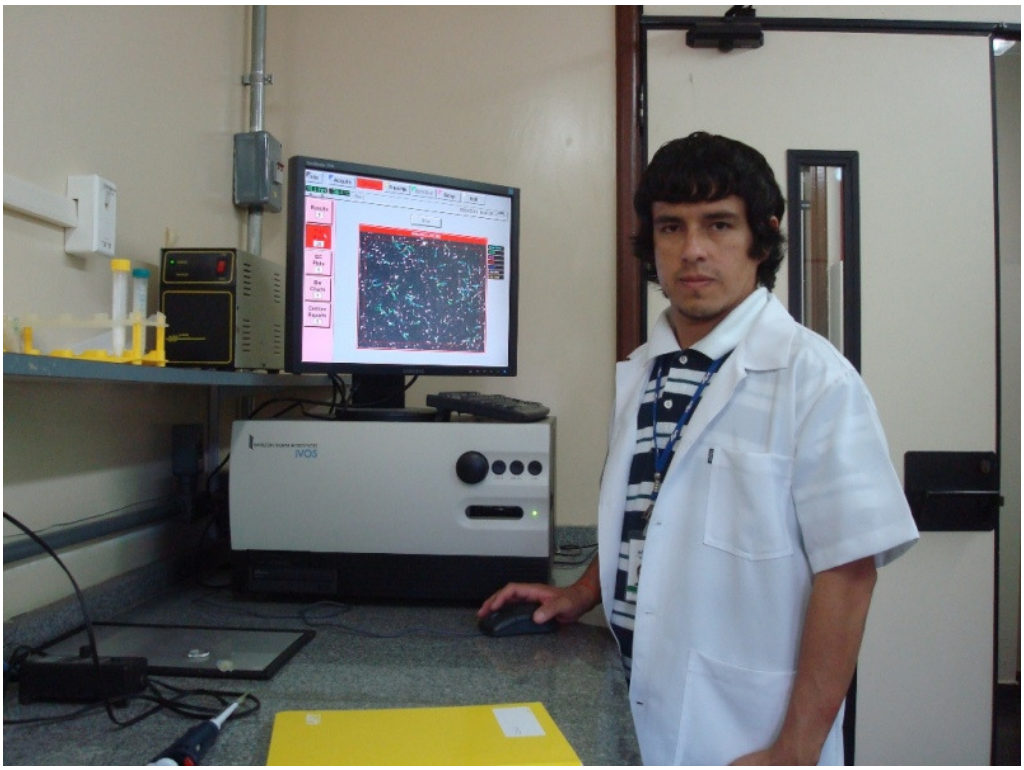

FIGURA 4 - *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA)

4.3.3 Avaliação de Integridade da membrana plasmática e do acrossoma

A integridade da membrana plasmática (Figura 5) foi avaliada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 395/420 nm excitação/emissão). Utilizaram-se diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP), conforme descrição de HARRISON & VICKERS (1990). Uma amostra de sêmen (10 µL) foi diluída em solução corante (40 µL), produzida a partir de 480 µL de citrato de sódio a 3%, 5 µL de formol salina a 1,6%, 5 µL de IP 0,75 mM e 10 µL de C-FDA 0,46 mg/mL em DMSO.

A integridade do acrossoma (Figura 6) foi avaliada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 nm excitação/emissão). Utilizou-se uma conjugação de isoticianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut aglutinin* – PNA) e IP, como descrito por KLINC & RATH (2007). Uma amostra de sêmen (10 µL) foi diluída em solução corante (30 mL) contendo os mesmos componentes utilizados na avaliação de integridade da membrana plasmática, exceto pelo C-FDA que foi substituído por 10 µL de FITC-PNA (1mg/mL em PBS).

Foram examinados cerca de 200 espermatozóides em cada exame, os resultados expressos em porcentagens e classificados da seguinte maneira:

a) Integridade da membrana plasmática

- Membrana íntegra: coloração verde na cabeça.
- Membrana lesada: coloração vermelha na cabeça.
- Membrana semi-lesada: coloração verde e vermelha na cabeça.

b) Integridade do acrossoma

- Espermatozóide morto com acrossoma íntegro: coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma.
- Espermatozóide morto com acrossoma reagido: coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma.
- Espermatozóide vivo com acrossoma íntegro: ausência de coloração na cabeça e acrossoma.
- Espermatozóide vivo com acrossoma reagido: ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma.

Levaram-se em conta como parâmetros que visam a fertilidade nos exames de fluorescência, a membrana plasmática íntegra e os espermatozóides vivos com acrossoma íntegro, procurando-se valores superiores por ter correlação positiva com a gestação nas fêmeas (GRAHAM, 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

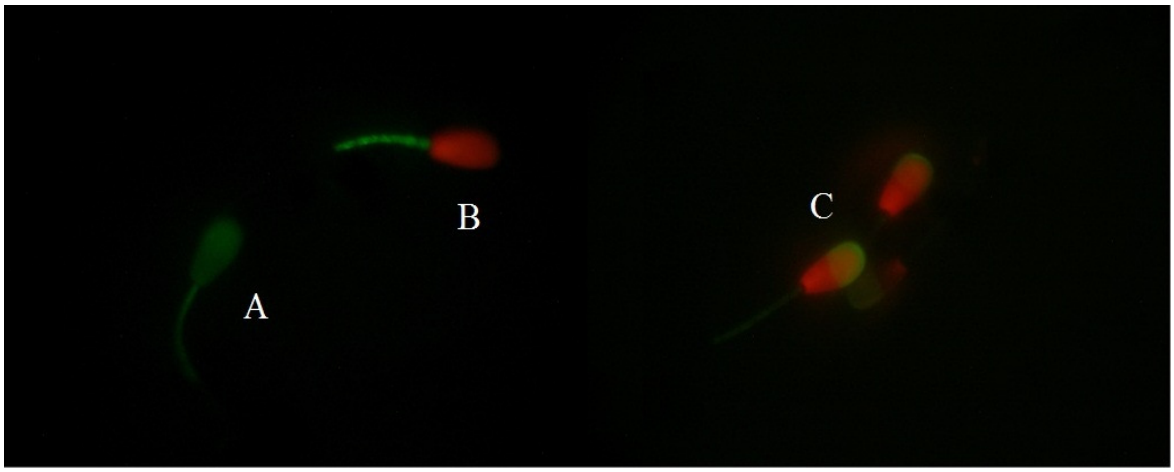

FIGURA 5 - Espermatozóides corados com C-FDA e IP. Membrana plasmática íntegra (A), lesada (B) e semi-lesada (C)

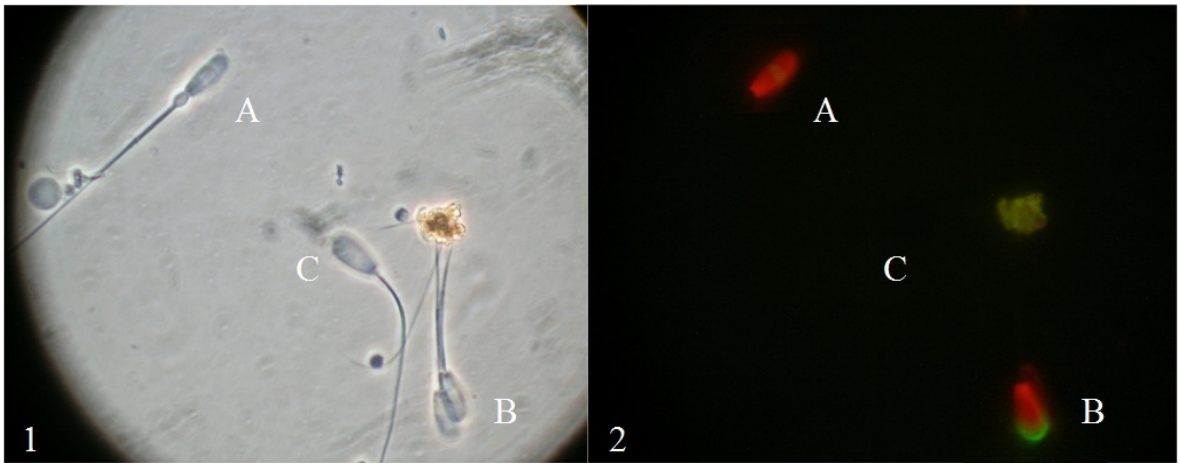

FIGURA 6 - Espermatozóides visualizados na Microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2). Espermatozóide morto com acrossoma íntegro (A) e espermatozóide morto com acrossoma reagido (B), corados na epifluorescência pela conjugação FITC-PNA-IP. O espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (C) não apresentou coloração FITC-PNA-IP

4.3.4 Avaliação das Taxas de fecundação *in vitro*

Foi utilizada parte da metodologia descrita por MACHADO et al. (2009).

a) Recuperação de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários procedentes de abatedouro foram coletados e transportados ao laboratório em solução salina (0,9% NaCl), suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 mg/mL) a 35°C. Puncionaram-se folículos com 2 a 8 mm de diâmetro por meio de agulha 18G, o material aspirado foi colocado em tubo cônico de 15 mL. Após sedimentação realizou-se a busca e classificação dos oócitos no estereomicroscópio, selecionando para maturação *in vitro* (MIV) os que possuíam citoplasma homogêneo e mínimo três camadas de células do *cumulus*. Os oócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 25 a 30, contidos em uma gota de 200 µL de meio de maturação sob óleo de silicone e incubados por 22 a 24 horas a 39 °C e 5% de CO_2. O meio de maturação era TCM 199 com sais de Earl's (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina e 50 µg/mL de estreptomicina.

b) Seleção espermática

O sêmen dos quatro touros Curraleiro/Pé Duro escolhidos, foi descongelado a 37°C por 30 segundos em banho Maria. Os espermatozóides foram selecionados por centrifugação em gradiente descontínuo Percoll (45:90%), sendo colocadas as amostras de sêmen sobre um volume total de 800 µL (400 µL de gradiente Percoll 45% e 400 µL de gradiente Percoll 90%), em microtubos de 1,7 mL e centrifugados a 5400 g por 5 minutos. Após centrifugação descartou-se o sobrenadante, e o pellet obtido foi centrifugado por 5 minutos em 1 mL de SP-TALP a 5400 g. O pellet resultante foi ressuspendido com meio de fecundação, para posterior avaliação espermática de motilidade, sendo o restante utilizado para a FIV. O meio de fecundação utilizado foi o TALP (PARRISH et al., 1995), suplementado com 2 mM de penicilina G sódica, 1mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina.

c) Fecundação *in vitro* (FIV)

Após maturação os oócitos foram transferidos para uma gota de 200 µL de meio de fecundação, e os espermatozóides que atravessaram o gradiente Percoll foram contados no hematocitômetro, sendo a concentração final da gota de 1 x 10^6 espermatozóides/mL. Para FIV os oócitos foram inseminados com os espermatozóides e co-incubados por 18 horas a 39 ℃ e 5% de CO_2.

d) Taxas de fecundação

Para avaliar as taxas de fecundação foi utilizada a metodologia descrita por CARVALHO et al. (2010), com três replicas independentes. Após 18 horas de inseminação *in vitro* possíveis zigotos de duas a três gotas de cada touro foram retirados e transferidos para uma gota de 200 µL de tampão fosfato (PBS), totalizando 336 oócitos, sendo em torno de 77 a 90 por touro. Estes possíveis zigotos foram desnudados e fixados em solução de etanol e ácido acético glacial (3:1), pelo menos 24 horas. Após fixação foram lavados e corados com solução lacmóide 1% em ácido acético glacial 45%. A leitura das lâminas foi no microscópio de contraste de fase sob imersão, com aumento de 1000 x (Nikon Eclipse E200), classificando-se em (Figura 7):

- Não fecundados: Presença de cromatina feminina e ausência de masculina.
- Fecundados: Presença cromatina feminina e espermatozóide no citoplasma, presença de cabeça descondensada, pronúcleo, clivagem e polispermia.

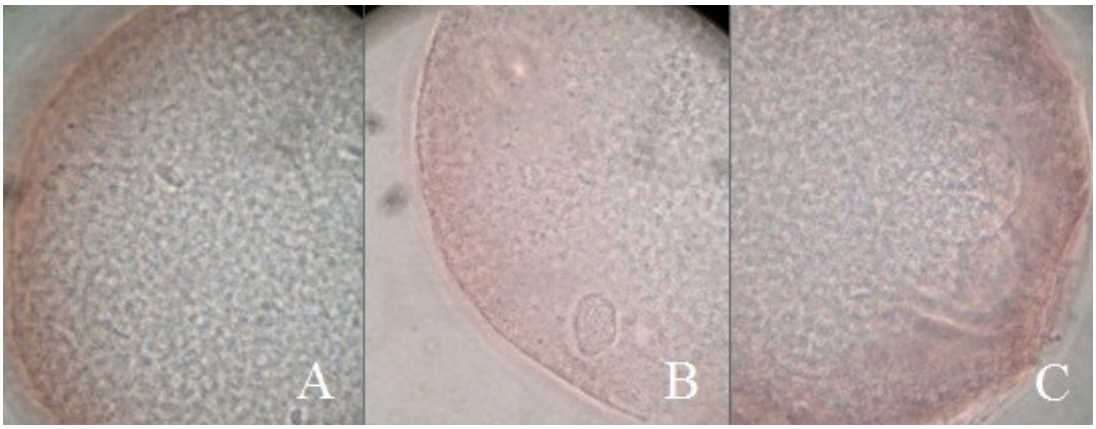

FIGURA 7 - Estágios encontrados nos zigotos 18 horas pós FIV: cabeça espermática (A), cabeça descondensada (B) e pronúcleos (C)

4.4 Delineamento experimental e Análise estatística

Partidas de sêmen criopreservado de 21 touros Curraleiro/Pé Duro foram utilizadas nesta pesquisa, visando avaliar os parâmetros espermáticos de morfologia, cinética, integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma. Também se avaliaram taxas de fecundação *in vitro* e estágios da cromatina masculina 18 horas pós FIV, com as doses de quatro touros, devido ao maior número de palhetas estocadas para esses animais. Após única avaliação espermática *in vitro* das 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro, obtiveram-se dados que foram colocados em planilhas Excel, e analisados por meio do programa R (R Development Core Team, 2011). Realizou-se estatística descritiva simples (média e desvio padrão) com os parâmetros mensurados nos quatro exames espermáticos, utilizando como referência comparativa, os padrões sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para sêmen descongelado bovino, assim como valores obtidos em outras pesquisas. Posteriormente escolheram-se os parâmetros mais importantes que visam a fertilização oocitária, sendo: na morfologia, a taxa de espermatozóides normais (NRM) e defeitos maiores (DMA); na cinética, a motilidade progressiva (MP) e células rápidas (RPD); na integridade da membrana plasmática, a membrana plasmática íntegra (MPI) e na integridade do acrossoma, o espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI). Realizaram-se correlações de Pearson, análise de Cluster e confecção de um dendrograma, com os seis parâmetros mencionados. O Cluster utilizou o método de aglomeração *average*, criando três grupos para cada um dos quatro exames espermáticos, sendo posteriormente seus parâmetros analisados mediante estatística descritiva simples, e as médias grupais comparadas pelos testes de Duncan (distribuição normal) e Kruskal Wallis (distribuição anormal), ao nível de significância de 5%. Na avaliação das taxas de fecundação, os resultados foram obtidos a partir de três réplicas feitas com o sêmen Curraleiro/Pé Duro escolhido, o qual passou previamente pelo gradiente de Percoll (45:90%), para posterior inseminação oocitária *in vitro*. A diferença estatística dos resultados foi calculada mediante Chi-quadrado, teste que também serviu para analisar os valores dos oócitos fecundados nos estágios da cromatina masculina 18 horas pós FIV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise descritiva

5.1.1 Morfologia espermática

Considerando 70% como taxa mínima de espermatozóides normais, sugerida pelo CBRA (1998) para sêmen bovino descongelado, as doses dos 21 touros Curraleiro/Pé Duro obtiveram uma média geral aceitável de 81,12% ± 13,30%. Nas médias individuais (Figura 8), as doses de três reprodutores foram inferiores ao valor sugerido: DT1 (60,19%); DT10 (37,50%) e DT17 (68,23%). O CBRA (1998) também indica que os defeitos maiores (DMA) não devem superar o 20% em uma amostra seminal, sendo que a média grupal (14,71% ± 9,94%) estava dentro do padrão, caso contrário ao resultado encontrado (21,06% ± 8,42%) por SOUSA et al. (2004), em 8 touros Curraleiro/Pé Duro. Individualmente a DT1 (34,71%), DT7 (24,25%), DT10 (39,50%), DT16 (22,50%) e DT17 (28,11%) obtiveram altas taxas para DMA, o que pode afetar a fertilidade da dose seminal.

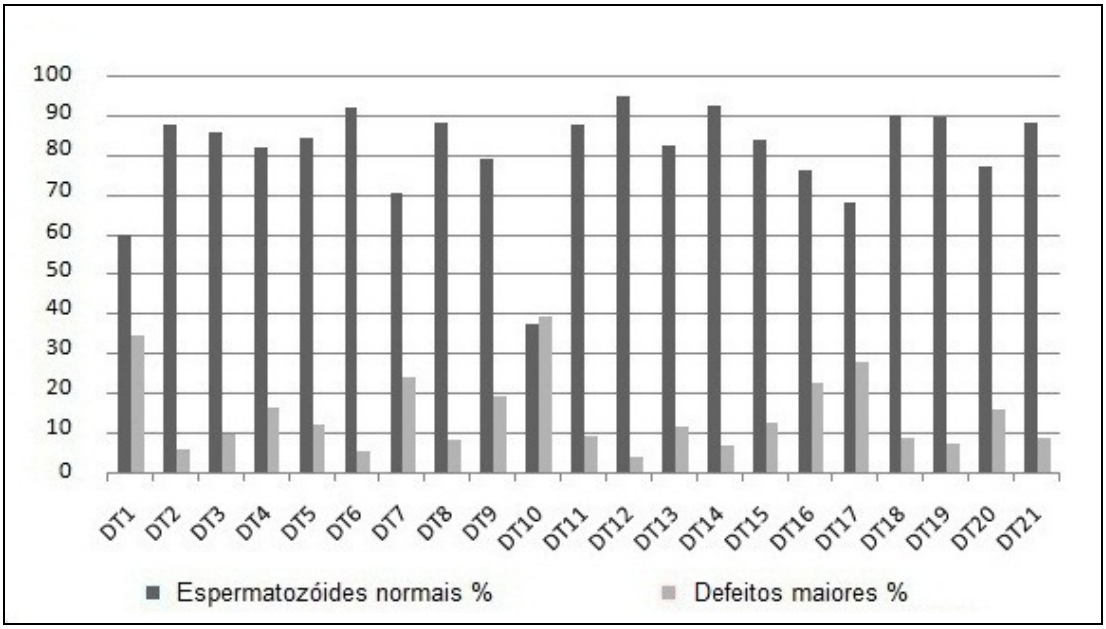

FIGURA 8 - Taxas de espermatozóides normais e defeitos maiores em 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

Foram analisadas as anormalidades morfológicas individuais, e dentro destas certos defeitos maiores superaram o limite de 5%, referido por FRENEAU (2011): DT1, cratera (21,76%), contorno anormal (5,56%); DT7, cauda fortemente dobrada com gota (7,07%); DT10, gota proximal (19,00%), cauda fortemente dobrada com gota (6,50%); DT16, cratera (9,00%); DT17, cauda fortemente dobrada com gota (15,10%) e DT20, cabeça piriforme (6,50%). BRITTO & MELLO (1988) também encontraram defeitos maiores que excederam os valores individuais sugeridos, no sêmen de cinco touros Curraleiro/Pé Duro, destacando *pouch formation* e coloração anormal da cabeça, com taxas máximas de 17,10% e 12,20% respectivamente, sendo atribuídas essas patologias a possíveis deficiências nutricionais, interferência climática e escasso processo de seleção deste grupo genético, em comparação aos taurinos de zonas temperadas.

SAACKE (2008) caracteriza a cratera, cabeça piriforme e *pouch formation* como defeitos incompensáveis, já que possuiriam aberrações na cromatina masculina que afetam a concepção. Segundo LAGERLOF (1934) se trataria de defeitos primários, por ter origem na degeneração epitelial dos túbulos seminíferos. As altas taxas encontradas de gota proximal e cauda fortemente dobrada com gota corresponderiam a defeitos secundários, sugerindo problemas de maturidade sexual, epidídimo e fertilidade no reprodutor (RAO et al., 1980).

5.1.2 Cinética espermática

Segundo KATHIRAVAN et al. (2011) altos percentuais de motilidade progressiva (MP) e células rápidas (RPD) revelam resistência à criopreservação. Esses autores indicaram a importância da MP em comparação a outros parâmetros também mensurados pelo CASA, já que contribui 62,60% nas variações das taxas de fertilização.

A MP grupal teve como média geral 27,33% ± 9,71% e as RPD 35,38% ± 11,40%. Observou-se na média individual (Figura 9) que as doses de quatro touros alcançaram os valores mais baixos na MP: DT8 (14%), DT10 (15%); DT18 (9%) e DT20 (13%). Nas RPD as doses de três touros obtiveram valores inferiores: DT10 (17%), DT18 (11%) e DT20 (17%).

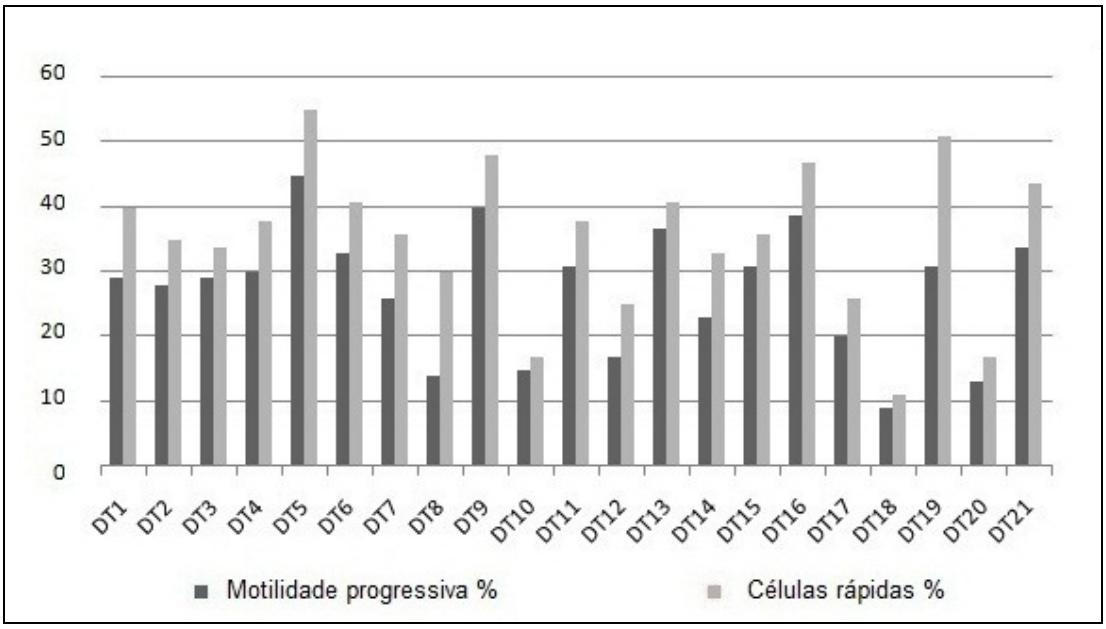

FIGURA 9 - Taxas de motilidade progressiva e células rápidas em 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

A DT19 revelou supostos indícios de hiperatividade espermática (HE), porque mostrou altos valores de VAP, VSL e VCL; o ALH (7,70µm) foi superior a 7 µm; 70% de STR, um dos menores no grupo; e 38% de LIN (ideal > 50%). A HE conduz a movimentos vigorosos e desordenados, com batimentos flagelares assimétricos, provocando trajetória irregular e curva, situação que deveria ocorrer próxima ao local de fertilização. Essa possível ativação precoce determinaria menor tempo de vida útil do espermatozóide, reduzindo a capacidade fecundante da dose seminal (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002). Sabe-se que a criopreservação provoca mudanças na membrana plasmática, similares às de capacitação *in vivo*. Esta "criocapacitação" após descongelamento pode ser responsável pela possível hiperatividade detectada (JANUSKAUSKAS et al., 1999; PETRUNKINA et al., 2005; CESARI et al., 2006).

A DT13 com boa MP (37%) e a DT10 com MP inferior (15%) mostraram valores superiores para BCF e inferiores para ALH, características que indicam a capacidade espermática de penetrar o muco cervical da fêmea. Além disso, tiveram os maiores valores na STR e LIN, revelando movimentação retilínea que favorece o trânsito no útero e a fecundação oocitária (MORTIMER, 1997).

5.1.3 Integridade da membrana plasmática e do acrossoma

Consideraram-se como parâmetros mais importantes a membrana plasmática íntegra (MPI) e os espermatozóides vivos com acrossoma íntegro (EVAI), obtendo na média geral: MPI 36,73% ± 14,16% e EVAI 34,00% ± 14,43%.

As doses com taxas mais baixas foram (Figura 10): MPI (DT10, 15,00%; DT14, 21,27% e DT18, 10,50%) e EVAI (DT2, 18,00%; DT10, 12,50%; DT14, 21,50%; DT18, 9,50% e DT20, 22,00%). GRAHAM (2001) indica a procura de altas porcentagens nesses exames de fluorescência, porque refletem a boa conformação estrutural e funcionalidade celular, o que correlaciona com altas taxas de prenhez nas fêmeas.

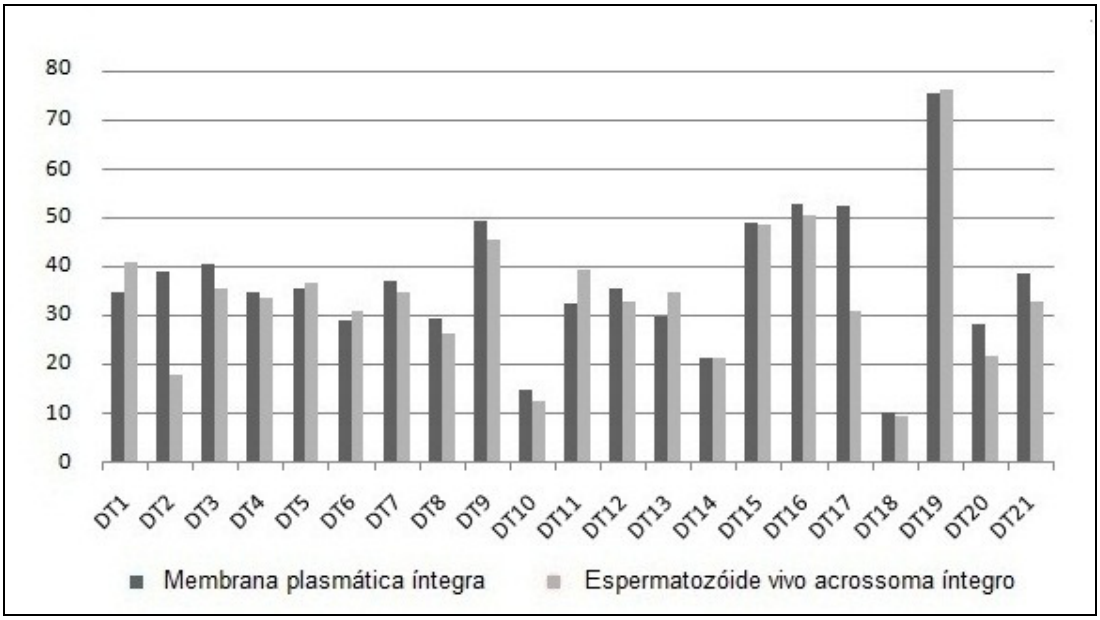

FIGURA 10 - Taxas de integridade da membrana plasmática e do acrossoma em 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

5.1.4 Parâmetros que visam a fertilidade nos exames espermáticos

Na Tabela 1, se mostram os parâmetros mais importantes que visam a fertilidade nos quatro exames espermáticos avaliados (morfologia, cinética, integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma).

TABELA 1 -Parâmetros que visam a fertilidade: espermatozóides normais (NRM), defeitos maiores (DMA), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RPD), membrana plasmática íntegra (MPI) e espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI)

Dose Touro	NRM%	DMA%	MP%	RPD%	MPI%	EVAI%
DT1	60,19	34,71	29,00	40,00	35,00	40,78
DT2	88,00	6,00	28,00	35,00	39,01	18,00
DT3	86,00	9,50	29,00	34,00	40,50	35,50
DT4	82,00	16,50	30,00	38,00	34,65	33,50
DT5	84,50	12,00	45,00	55,00	35,50	36,68
DT6	92,50	5,50	33,00	41,00	29,09	31,00
DT7	70,71	24,25	26,00	36,00	37,32	34,93
DT8	88,61	7,94	14,00	30,00	29,38	26,36
DT9	79,50	19,00	40,00	48,00	49,50	45,50
DT10	37,50	39,50	15,00	17,00	15,00	12,50
DT11	88,00	9,00	31,00	38,00	32,50	39,41
DT12	95,00	4,00	17,00	25,00	35,50	33,00
DT13	82,59	11,49	37,00	41,00	29,85	34,91
DT14	93,00	6,50	23,00	33,00	21,27	21,50
DT15	84,29	12,38	31,00	36,00	48,87	48,50
DT16	76,50	22,50	39,00	47,00	53,00	50,50
DT17	68,23	28,11	20,00	26,00	52,61	31,00
DT18	90,50	8,50	9,00	11,00	10,50	9,50
DT19	90,00	7,00	31,00	51,00	75,50	76,00
DT20	77,50	16,00	13,00	17,00	28,26	22,00
DT21	88,50	8,50	34,00	44,00	38,50	33,00

Das 21 doses apresentadas, dez possuíam alguns valores adversos para a fertilização: DT1 (NRM, DMA); DT2 (EVAI); DT7 (DMA), DT8 (MP); DT10 (NRM, DMA, MP, RPD, MPI e EVAI); DT14 (MPI e EVAI); DT16 (DMA); DT17 (NRM e DMA); DT18 (MP, RPD, MPI e EVAI) e DT20 (MP, RPD e EVAI). Ao comparar em cada dose mencionada os seis parâmetros espermáticos, detectaram-se divergências, já que sete tinham valores inferiores aos sugeridos em uns exames e valores favoráveis em outros, confirmando a complexa natureza do espermatozóide (GRAHAM & MOCÉ, 2005). Com as sete doses seminais se formaram dois grupos (A e B), buscando a melhor descrição das características espermáticas (Tabela 2). Utilizou-se como critério de agrupamento os valores obtidos para NRM e DMA, segundo os padrões sugeridos pelo CBRA (1998).

TABELA 2 - Doses espermáticas com divergências entre os parâmetros que visam a fertilidade

Dose Touro	NRM%	DMA%	MP%	RPD%	MPI%	EVAI%
Grupo A						
DT1	60,19	34,71	29,00	40,00	35,00	40,78
DT16	76,50	22,50	39,00	47,00	53,00	50,50
DT17	68,23	28,11	20,00	26,00	52,61	31,00
Grupo B						
DT2	88,00	6,00	28,00	35,00	39,01	18,00
DT8	88,61	7,94	14,00	30,00	29,38	26,36
DT14	93,00	6,50	23,00	33,00	21,27	21,50
DT18	90,50	8,50	9,00	11,00	10,50	9,50

Espermatozóides normais (NRM), defeitos maiores (DMA), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RPD), membrana plasmática íntegra (MPI) e espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI)

O Grupo A (DT1, DT16 e DT17) mostrou valores inferiores de espermatozóides normais e altas taxas de defeitos maiores, mas por outro lado boa cinética e viabilidade, que fornecerão oportunidades para competir pela fertilização. Estas características espermáticas são próprias dos defeitos incompensáveis descritos por SAACKE (2008), os quais permitem fertilizar o oócito, mas interferem na manutenção da fertilização ou embriogênese.

No Grupo B (DT2, DT8, DT14 e DT18), se obtiveram altas taxas de espermatozóides normais, no entanto muitos eram inviáveis (deteriorados ou mortos) e de movimentação lenta, concordando com o relato de GARNER et al. (1986), onde células espermáticas com membrana plasmática lesada possuem cinética inferior. Vale salientar que as características encontradas pertencem aos defeitos compensáveis, os quais são deletérios para o espermatozóide no transporte através do trato reprodutivo feminino, mas com o incremento da dose inseminante, células competentes podem atenuar o problema e fertilizar o oócito (SAACKE, 2008).

5.2 Correlações

Analisaram-se as correlações de Pearson dos parâmetros mais importantes que visam fertilidade nos quatro exames espermáticos realizados (Tabela 3).

TABELA 3 - Correlações de Pearson dos parâmetros que visam a fertilidade: espermatozóides normais (NRM), defeitos maiores (DMA), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RPD), membrana plasmática íntegra (MPI) e espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (EVAI)

	NRM%	DMA%	MP%	RPD%	MPI%	EVAI%
NRM%	1	-0,96	0,15	0,24	0,13	0,17
DMA%	-0,96	1	-0,08	-0,15	-0,03	-0,06
MP%	0,15	-0,08	1	0,93	0,48	0,60
RPD%	0,24	-0,15	0,93	1	0,61	0,73
MPI%	0,13	-0,03	0,48	0,61	1	0,88
EVAI%	0,17	-0,06	0,60	0,73	0,88	1

Os parâmetros MP / RPD (0,93); MPI / EVAI (0,88) e RPD / EVAI (0,73) obtiveram estimativas de correlação alta, enquanto RPD / MPI (0,61), MP / EVAI (0,60) e MP / MPI (0,48) correlação moderada. DMA mostrou correlações negativas com todos os parâmetros (NRM, MP, RPD, MPI e EVAI).

Estes resultados indicaram que espermatozóides com membrana plasmática íntegra serão viáveis para se capacitar, conservar o acrossoma íntegro e realizar reação acrossomal, assim como apresentar boa motilidade, características primordiais para a fertilização. Enquanto espermatozóides com elevadas taxas de defeitos maiores terão problemas na movimentação e integridade das membranas celulares o que afetaria o potencial reprodutivo da dose seminal (GARNER et al., 1986; AMANN, 1989). Fato que aponta à morfologia como característica de grande interesse para análise espermática, concordando com FITZPATRICK et al. (2002), que consideraram isoladamente este aspecto como o mais relacionado com a fertilidade no rebanho.

5.3 Análise de Cluster, dendrograma e estatística descritiva dos grupos

Para análise de Cluster e confecção de um dendrograma (Figura 11), utilizaram-se os parâmetros mais importantes que visam a fertilidade nos quatro exames espermáticos realizados (Tabela 1).

O Cluster formou três grupos (G1, G2 e G3) segundo similaridade dos valores obtidos nas amostras seminais: G1: DT16, DT9, DT15, DT5, DT21, DT6, DT13, DT11, DT3, DT4, DT2. G2: DT7, DT1, DT17. G3: DT12, DT8, DT14.

Cabe ressaltar que no dendrograma se encontraram duas doses fora dos grupos, a DT19 e DT10, já que foram consideradas *outliers* (discrepantes), ao apresentarem valores atípicos, com grande afastamento em relação às demais amostras, podendo influenciar na acurácia das analises estatísticas a realizar (SARTORIO, 2008). A DT19 obteve valores altamente favoráveis para fertilização oocitária, oposto da DT10, que alcançou em todos os resultados as piores taxas.

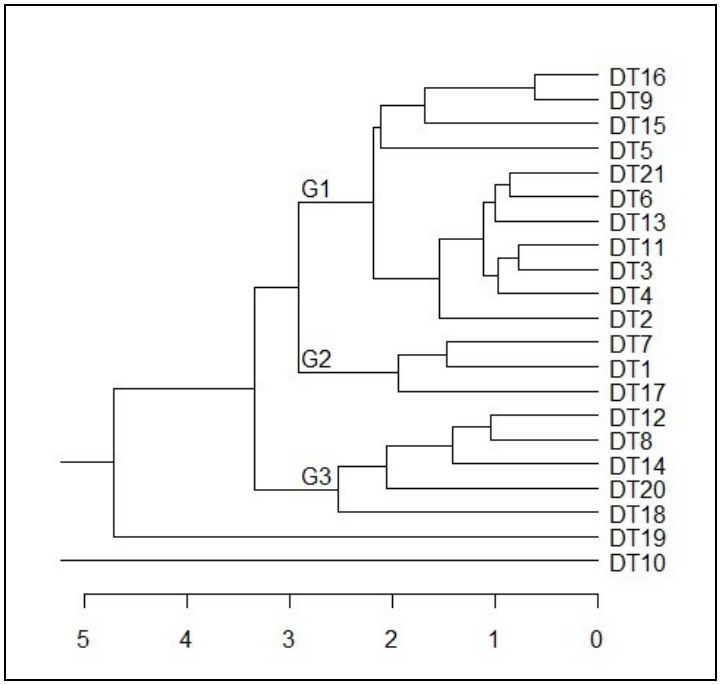

FIGURA 11 - Cluster e Dendrograma de 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro, segundo parâmetros que visam a fertilidade nos exames espermáticos realizados

5.3.1 Morfologia espermática

Na Tabela 4, observam-se os três grupos formados, mostrando as taxas de espermatozóides normais, assim como defeitos espermáticos segundo localização estrutural e classificação de BLOM (1973).

TABELA 4 - Morfologia espermática dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

Morfologia espermática (%)	G1		G2		G3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Espermatozóides normais	84,76[a]	4,53	66,38[b]	5,50	88,92[a]	6,83
Defeitos cabeça	7,03[ab]	4,42	16,95[a]	17,40	5,20[b]	4,95
Defeitos peça intermediária	3,26[a]	1,96	4,75[a]	4,09	3,29[a]	1,98
Defeitos peça principal	4,96[b]	2,32	11,92[a]	9,06	2,59[b]	1,29
Defeitos maiores	12,03[b]	5,34	29,02[a]	5,29	8,59[b]	4,49
Defeitos menores	3,21[a]	1,72	4,60[a]	0,83	2,49[a]	2,52
Defeitos totais	15,24[b]	4,53	33,62[a]	5,49	11,08[b]	6,83

G1= grupo 1, G2 = grupo 2, G3 = grupo 3. DP = desvio padrão

Observa-se que G1 e G3 conseguiram taxas de espermatozóides normais e defeitos maiores dentro dos padrões do CBRA (1998), revelando boa condição morfológica destas células. Caso oposto do G2, que obteve valores adversos e, além disso, altas taxas para defeitos totais, de cabeça e peça principal, que podem interferir no deslocamento espermático (FRENEAU, 2011).

Suspeita-se como uma possível origem dos defeitos encontrados, o estresse térmico, que segundo SETCHELL (1998) causa degeneração no epitélio testicular, comprometendo a função dos túbulos seminíferos e epidídimo, que provocaria aparição de patologias espermáticas. FRENEAU (2011) indica que o fato dos touros estarem submetidos a altas temperaturas durante o dia, pode esgotar o mecanismo de termorregulação testicular, gerando espermatozóides com defeitos nos ejaculados. TEIXEIRA et al. (2009) e TEIXEIRA et al. (2011) sugeriram que no Centro Oeste brasileiro, a estação da seca pode reduzir o número de espermatogônias no epitélio dos túbulos seminíferos, e incrementar a degeneração das células espermáticas em desenvolvimento.

5.3.2 Cinética espermática

Na Tabela 5, se observam os parâmetros da cinética espermática, dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.

TABELA 5 - Cinética espermática dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

Cinética espermática	G1		G2		G3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Motilidade total - MT (%)	51,36[a]	7,28	47,00[a]	5,20	32,40[b]	14,15
Motilidade progressiva - MP (%)	34,27[a]	5,35	25,00[b]	4,58	15,20[c]	5,22
Velocidade de trajeto - VAP (µm/s)	77,45[a]	13,20	68,90[a]	12,13	68,30[a]	7,21
Velocidade linear - VSL (µm/s)	64,09[a]	11,00	54,20[a]	9,44	52,26[a]	8,03
Velocidade curvilinear - VCL (µm/s)	130,38[a]	24,56	118,17[a]	19,71	121,02[a]	12,47
Amplitude de batimento da cabeça - ALH (µm)	5,89[b]	0,62	6,03[ab]	0,42	6,76[a]	0,64
Frequência de batimento da cauda - BCF (Hz)	30,10[a]	2,65	26,13a[b]	5,88	23,34[b]	4,72
Retilinearidade - STR (%)	82,09[a]	1,58	79,00[ab]	0.00	76,20[b]	5,89
Linearidade - LIN (%)	50,91[a]	2,51	48,33[ab]	2,31	44,60[b]	4,51
Células Rápidas - RPD (%)	41,55[a]	6,44	34,00[a]	7,21	23,20[b]	9,12

G1= grupo 1, G2 = grupo 2, G3 = grupo 3. DP = desvio padrão

Na MT e MP, o G1 foi superior, seguido do G2, e por último o G3 que obteve as taxas mais baixas, revelando menor motilidade espermática. As velocidades (VAP, VSL e VCL) foram similares nos três grupos. Segundo GOOVAERTS et al. (2006) a VAP encontrada foi rápida (> 50 µm/s), fato favorável já que contribui no transporte do espermatozóide através do trato reprodutivo feminino, e penetração da ZP do oócito (OLDS-CLARKE, 1996; GOOVAERTS et al., 2006). Na ALH o G3 obteve a maior taxa, seguido do G2, enquanto G1 alcançou a menor taxa. Na BCF o G1 foi superior a G2 e G3. Os valores do G1 refletem uma adequada amplitude lateral da cabeça e freqüência de batimentos da cauda, que na comparação com os outros dois grupos, teria

melhor progressão espermática para penetrar o muco cervical da fêmea e estruturas peri-oocitárias (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; ROBAYO et al., 2008). Estas características foram confirmadas ao conseguir o G1 altas taxas de STR, LIN e RPD, as quais evidenciaram uma trajetória espermática muito regular e linear, favorecendo a migração através do trato reprodutivo feminino (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002; ROBAYO et al., 2008). Caso similar aconteceu com G2, no entanto G3 mostrou taxas inferiores na STR, LIN e RPD, que concordaram com seus valores inferiores na MT e MP, revelando menor motilidade, rapidez e linearidade espermática.

5.3.3 Integridade da membrana plasmática e do acrossoma

Na Tabela 6 se observam os parâmetros de integridade da membrana plasmática, dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.

TABELA 6 - Integridade da membrana plasmática dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

Integridade da membrana plasmática (%)	G1		G2		G3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Membrana plasmática lesada – MPL	44,88[a]	10,96	50,90[a]	6,49	53,26[a]	10,77
Membrana plasmática semilesada – MPSL	15,94[a]	5,75	7,45[b]	3,19	21,76[a]	7,06
Membrana plasmática íntegra – MPI	39,18[a]	8,13	41,64[a]	9,57	24,98[b]	9,54

G1= grupo 1, G2 = grupo 2, G3 = grupo 3. DP = desvio padrão

Na MPL os três grupos alcançaram os mesmos percentuais, enquanto na MPSL o G1 e G3 obtiveram taxas superiores a G2. A soma destes dois parâmetros em cada grupo revelou a grande quantidade de células com alguma lesão na membrana (> 58%). Na MPI o G1 e G2 conseguiram as taxas mais altas, a diferença do G3 que obteve a mais baixa, indicando maior viabilidade espermática no G1 e G2, que fornecerá melhores chances para a fecundação.

Na Tabela 7 se observam os parâmetros da integridade do acrossoma, dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro.

TABELA 7 - Integridade de acrossoma dos grupos formados com as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro

Integridade do acrossoma (%)	G1		G2		G3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Espermatozóide morto acrossoma íntegro – EMAI	32,51[a]	6,92	21,16[b]	9,44	41,17[a]	10,52
Espermatozóide morto acrossoma reagido – EMAR	29,82[a]	10,60	37,79[a]	4,94	35,76[a]	12,98
Espermatozóide vivo acrossoma íntegro – EVAI	36,95[a]	9,08	35,57[a]	4,92	22,47[b]	8,59
Espermatozóide vivo acrossoma reagido – EVAR	0,71[b]	0,79	5,48[a]	7,83	0,60[b]	0,82

G1= grupo 1, G2 = grupo 2, G3 = grupo 3. DP = desvio padrão

No EMAI o G1 e G3 foram superiores a G2, enquanto no EMAR todos obtiveram os mesmos resultados. Estes valores mostraram altas taxas de espermatozóides mortos em cada grupo (> 58%). Nos parâmetros que mensuraram células vivas, o EVAI foi superior no G1 e G2, mas no G3 foi inferior, indicando menor número de espermatozóides competentes para a fertilização. Resultados similares para EVAI foram obtidos por TEIXEIRA et al. (2008) e RAMOS et al. (2009), em doses seminais de catorze touros Crioulo Lageano (36,00%) e vinte touros Pantaneiros (37,90%), pertencentes ao BBGA. No EVAR só G2 alcançou o valor mais alto, já que G1 e G3 obtiveram taxas menores a 1%, sugerindo que as células do G2 podem ter sofrido adiantada reação acrossomal.

As elevadas taxas de células lesadas, mortas e acrossoma reagido, apontam à criopreservação como fator negativo, sabendo que as membranas são as primeiras estruturas em sofrer a variação das temperaturas (THOMAS et al., 1998; JANUSKAUSKAS et al., 1999; MEDEIROS et al., 2002). Nos parâmetros MPI e EVAI, o G1 e G2 alcançaram valores aceitáveis, indicando capacidade para atravessar o trato reprodutivo feminino (JANUSKAUSKAS et al., 1999) e obter prenhez na fêmea (PHILLIPS et al., 2004). Contrário do G3, que conseguiu taxas inferiores, diminuindo oportunidades para a fertilização (MEDEIROS et al., 2002).

Na descrição final dos três grupos temos que: G1 obteve valores aceitáveis na morfologia espermática, a melhor cinética, viabilidade razoável e mais espermatozóides vivos com acrossoma íntegro. Estes resultados revelaram maiores oportunidades para conseguir a fertilização, em comparação aos outros grupos. G2 mostrou alta taxa de defeitos morfológicos (destacando da cabeça), cinética razoável, melhor viabilidade e valores aceitáveis de espermatozóides vivos com acrossoma íntegro. Segundo SAACKE (2008) se trataria possivelmente de características espermáticas incompensáveis. Caso distinto do G3, que evidenciou ter menos defeitos espermáticos, mas as piores taxas na cinética e exames de fluorescência, indicando características compensáveis. O G2 e G3 sugerem um adequado uso das doses seminais, para obter taxas de fertilização oocitária e posterior embriogênese.

5.4 Avaliação das Taxas de fecundação *in vitro*

Foram utilizadas doses de quatro touros (DT18, DT19, DT20 e DT21) para serem desafiadas na avaliação das taxas de fecundação *in vitro* (Tabela 8).

TABELA 8 - Doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro escolhidas para avaliação das Taxas de fecundação *in vitro*

Grupo	Dose Touro	NRM%	DMA%	MP%	RPD%	MPI%	EVAI%
G3	DT18	90,50	8,50	9,00	11,00	10,50	9,50
Outliers	DT19	90,00	7,00	31,00	51,00	75,50	76,00
G3	DT20	77,50	16,00	13,00	17,00	28,26	22,00
G1	DT21	88,50	8,50	34,00	44,00	38,50	33,00

NRM (espermatozóides normais), DMA (defeitos maiores), MP (motilidade progressiva), RPD (células rápidas), MPI (membrana plasmática íntegra), EVAI (espermatozóide vivo com acrossoma íntegro). G1 = grupo 1, G3 = grupo 3

As doses foram escolhidas pelo amplo estoque de palhetas doadas pelo BBGA para esses reprodutores, possibilitando realizar três réplicas *in vitro*.

Estas doses seminais pertenciam ao G1 (DT21), G3 (DT18, DT20) e *"outliers"* (DT19). Observou-se que todas as amostras espermáticas possuíam taxas de morfologia normal (NRM) e defeitos maiores (DMA), dentro dos padrões sugeridos pelo CBRA (1998). Entretanto, observaram-se valores negativos na DT18 e DT20, porque possuíam taxas inferiores nos exames de motilidade e fluorescência. Situação que era de esperar-se, já que células com membrana plasmática lesada (mortas) não possuem movimento (GARNER et al., 1986). Vale salientar que MATYUS et al. (1984) relataram problemas na fecundação, devido à correlação entre infertilidade e taxas de membrana plasmática lesada.

Previamente à utilização das doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro na FIV, estas foram preparadas para obter maiores chances de fecundação, sendo submetidas a seleção mediante gradiente Percoll (45:90%), eliminando assim os espermatozóides que possuíam defeitos e injurias que afetassem a hidrodinâmica celular. Avaliou-se a motilidade no microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200) tanto pré como após passagem pelo gradiente, sendo os resultados comparados com a motilidade progressiva, mensurada anteriormente pelo CASA (Figura 12).

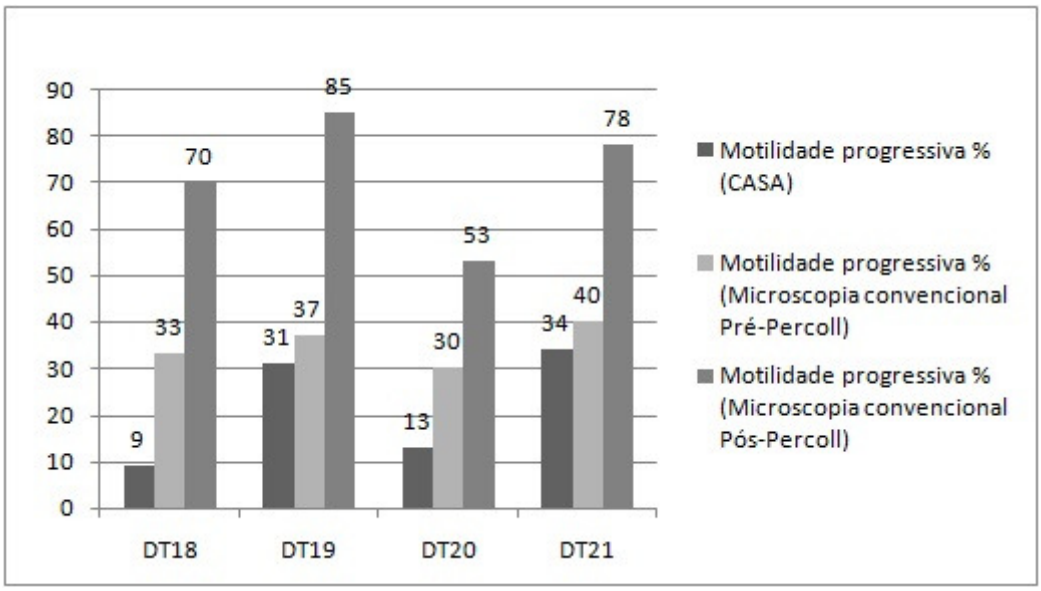

FIGURA 12 - Motilidade progressiva mensurada pelo CASA e microscopia convencional, das doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro escolhidas para FIV

Observa-se que a motilidade progressiva após Percoll incrementou consideravelmente em comparação às avaliações anteriores, mostrando valores superiores, dentro dos padrões sugeridos pelo CBRA (1998). Conforme RODRIGUEZ-MARTINEZ (2005) o teste mensura a capacidade espermática de migração ao longo do trato reprodutivo feminino, sendo selecionados os espermatozóides com potencial para ultrapassar *in vitro* a barreira do Percoll, que simularia o trajeto *in vivo* até o local de fertilização (istmo).

Uma vez tratadas as doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro a utilizar na FIV, continuou-se com a seleção e inseminação *in vitro* de 336 oócitos, para avaliar as Taxas de fecundação (Tabela 9). Nos resultados obtidos a DT20 alcançou a taxa mais alta (80,49%) de oócitos fecundados, enquanto a DT21 a mais baixa (68,83%).

TABELA 9 - Taxas de fecundação oocitária 18 horas pós inseminação *in vitro*

Grupo	Dose Touro	N oócitos	Fecundado		Não Fecundado		P-valor X^2
			N	%	N	%	
G3	DT18	90	67	74,44	23	25,56	0,38
Outliers	DT19	87	67	77,01	20	22,99	
G3	DT20	82	66	80,49	16	19,51	
G1	DT21	77	53	68,83	24	31,17	

G1 = grupo 1, G3 = grupo 3. N = número. X^2 = Chi-quadrado

As taxas de fecundação foram altas e próximas, sem diferença estatística significativa, revelando resultados não esperados antes da passagem espermática pelo gradiente (45:90%), como foi o caso da DT18 e DT20. Doses que tinham valores inferiores nos parâmetros de motilidade e fluorescência, mas após Percoll mostraram boa motilidade progressiva (70%; 53%) e inclusive altas taxas de fecundação (74,44%; 80,49%).

Os percentuais de oócitos fecundados (> 60%) foram considerados aceitáveis segundo TANGUE et al. (2002), revelando a capacidade espermática *in vitro* das doses escolhidas de sêmen Curraleiro/Pé Duro, para ligar e penetrar a ZP do oócito, assim como promover fertilização.

Na Tabela 10, observam-se as taxas que representam os diferentes estágios da cromatina masculina, 18 horas pós inseminação *in vitro*.

TABELA 10 - Estágios da cromatina masculina 18 horas pós inseminação *in vitro*

Dose Touro	N oócitos	Fecundado								P-valor X^2
		Cabeça Sptz		Cabeça descondensada		Pronúcleo		PP		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
DT18	67	2	2,99	4	5,97	56	83,58	5	7,46	
DT19	67	6	8,96	1	1,49	57	85,07	3	4,48	3,49 x 10^5
DT20	66	8	12,12	1	1,52	54	81,82	3	4,55	
DT21	53	7	13,21	13	24,53	32	60,38	1	1,89	

N = número. Sptz = espermatozóide, PP = polispermia. X^2 = Chi-quadrado

Constata-se que os zigotos apresentavam valores estatisticamente diferentes, com a cromatina masculina majoritariamente em estágio de pronúcleo (taxas > 60%). A DT19 obteve o maior percentual, enquanto a DT21 o menor, e, além disso, um valor elevado para cabeça descondensada. Segundo EID et al. (1994) isto revelaria uma fecundação tardia da DT21, em comparação às outras doses, fato que pode afetar posteriores estágios de embriogênese.

Finalmente, segundo os resultados obtidos a partir das 21 doses de sêmen Curraleiro/Pé Duro, sugere-se que a DT19 e o G1 se utilizem na inseminação artificial a campo, por ter valores favoráveis para a fecundação *in vivo*, sabendo que só células competentes terão contato com o oócito (BARBAS & MASCARENHAS, 2009). Diferente situação da DT10, G2 e G3, onde as doses devem ser utilizadas na PIVE, já que a passagem pelo gradiente Percoll eliminará células defeituosas e lesadas. Além disso, a FIV permitirá o contato direto dos oócitos com centos de espermatozóides, fornecendo assim maiores chances para a fecundação e embriogênese.

Dessa forma se evitará a perda das valiosas doses de sêmen estocadas no BBGA, pertencentes a estes 21 touros Curraleiro/Pé Duro, mediante o adequado direcionamento do seu uso na inseminação artificial *in vivo* ou *in vitro*, buscando conseguir a máxima produção de bezerros e/ou embriões, para a conservação *in situ* e *ex situ* deste bovino crioulo brasileiro em perigo de extinção.

6 CONCLUSÕES

A qualidade seminal encontrada nas doses dos 21 touros Curraleiro/Pé Duro foi diversa, mostrando características favoráveis para a fecundação na DT19 e G1, assim como defeitos compensáveis e incompensáveis que atentam contra ela na DT10, G2 e G3. Fato pelo qual estas doses espermáticas devem ser manejadas criteriosamente, tanto na inseminação artificial a campo, como no laboratório, em associação a biotecnologias reprodutivas que visem resultados positivos. Permitindo dessa maneira a conservação *in situ* e *ex situ* do gado Curraleiro/Pé Duro, através de programas de recuperação do efetivo populacional e criopreservação de espermatozóides e embriões em bancos de germoplasma. Sendo também interessante investigar a utilização deste recurso genético local, em cruzamentos com raças comerciais, buscando inserir futuramente características de rusticidade e adaptação nos rebanhos bovinos brasileiros.

REFERÊNCIAS

1. AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 682-691, 2008.

2. ALMEIDA, G. M. **Caracterização genética da raça Pé-Duro utilizando microssatélites ancorados**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

3. ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, p. 48-61, 2008.

4. AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, Kansas, v. 10, n. 2, p. 89-98, 1989.

5. AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, Kansas, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.

6. AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 895-907, 2004.

7. 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 TEF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais eletrônicos**...[on line]. Londrina: Geraembryo, 2004. p. 166-179. Disponível em: http://www.geraembryo.com.br/artigos/importancia-da-qualidade-do-semen-em-programas-de-iatf-e-tetf. Acesso em: 28 jul. 2011.

8. 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, 2011.

9. AZEVEDO, D. M. M. R.; ALVES, A. A.; FEITOSA, F. S.; MAGALHÃES, J. A.; MALHADO, C. H. M. Adaptabilidade de bovinos da raça Pé-duro às condições climáticas do semi-árido do estado do Piauí. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, n. 220, p. 513-523, 2008.

10. BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and tissue banking**, Dordrecht, v. 10, p. 49-62, 2009.

11. BARBOSA, V.; IRION, R. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; MAGNABOSCO, C. D. U.; MADUREIRA, A. P. Caracterização fenotípica e medidas corporais de bovinos da raça Pé-Duro - Resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 14., 2004, Brasília. **Anais eletrônicos**...[on line]. Brasília: ABZ, 2004. Disponível em: http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos. Acesso em: 17 abr. 2011.

12. BARINI, A. C. **Bioquímica sérica de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro de diferentes idades**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

13. BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa: Ames, 1989. 285 p.

14. BIANCHINI, E.; McMANUS C.; LUCCI, C. M.; FERNANDES, M. C. B.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1443-1448, 2006.

15. BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, v. 25, p. 383-391, 1973.

16. BRITTO, C. M. C. **Características morfológicas e citoquímicas de espermatozóides de sêmen de bovinos de rebanho de elite e de gado "Pé-Duro"**. 1987. 148 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

17. BRITTO, C. M. C.; MELLO, M. L. S. Anomalias de cabeça em espermatozóides de gado "Pé Duro". **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 63-71, 1988.

18. CARVALHO, J. H. Conservação do Gado Pé Duro (Curraleiro). Embrapa Meio-Norte. 1999. Disponível em: http://www.cpamn.embrapa.br/publicacoes/folders/1999/peduro.pdf. Acesso em: 07 fev. 2011.

19. CARVALHO, J. H.; MONTEIRO, F. C.; GIRÃO, R. N. Conservação do Bovino Pé-Duro ou Curraleiro: Situação Atual. Embrapa Meio-Norte. **Documentos**, 58, 2001. Disponível em: www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/54346. Acesso em: 11 fev. 2011.

20. CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; MACHADO, G. M.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow citometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

21. CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBNIS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, Kansas, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.

22. CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

23. CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 188 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

24. CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 479-488, 2007.

25. CESARI, A.; KAISER, G. G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M. W.; ALBERIO, R. H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 1185-1193, 2006.

26. CHACÓN, J. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 36, p. 91-99, 2001.

27. COELHO, M. M. S.; BORGES, A. C.; BARINI, A. C.; PAULA NETO, J. B.; CHIQUETTO, C. E.; FIORAVANTI, M. C. S. Constituintes bioquímicos normais de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro, em diferentes faixas etárias, criados em regime extensivo. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 1., 2004, Goiânia. **Anais eletrônicos**...[on line]. Goiânia: CONPEEX, 2004. Disponível em: http://www.ufg.br/conpeex/2004/pibic/agro/Madalena.html. Acesso em: 25 ago. 2011.

28. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

29. COSTA, M. F. O.; EGITO, A. A.; FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S. Qualidade da carne: podemos evitar a extinção de raças bovinas naturalizadas?. Embrapa Pantanal. **Artigo de Divulgação na Mídia**, 149, 2011. Disponível em: http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM149.pdf. Acesso em: 18 out. 2011.

30. CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 41, p. 635-641, 1989.

31. DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 319-341, 2005.

32. DEN DAAS, J. H. G. **Prediction of bovine male fertility**. 1997. 164 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Instituto de Ciências Animais, Universidade de Wageningen, Wageningen.

33. DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 26, p. 32-37, 2002.

34. EGITO, A. A.; PAIVA, S. R.; MAMANI, E. M.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; McMANUS, C.; CASTRO, S.; MARIANTE, A. S.; GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade genética de raças bovinas baseada em marcadores STR. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais eletrônicos**...[on line]. João Pessoa: SBMA, 2004. Disponível em: http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/trabalhos. Acesso em: 10 abr. 2011.

35. EGITO, A. A.; FUCK, B.; SPRITZE, A. L.; OLIVEIRA, R. R.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. S.; RIBEIRO, M. N.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; CASTRO, S. T. R.; SANTOS, S. A. RAPD markers utilization on the formation or maintenance of conservation nuclei of livestock species. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 54, n. 206-207, p. 277-281, 2005.

36. EGITO, A. A.; FIORAVANTI, M. C. S.; GRATTAPAGLIA, D.; RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. Origem e diversidade genética materna de populações de bovinos da raça Curraleira de diferentes regiões do Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, Córdoba, v. 1, p. 110-113, 2011.

37. EID, L. N.; LORTON, S. P.; PARRISH, J. J. Paternal influence on S-Phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, p. 1232-1237, 1994.

38. FARREL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 871-879, 1998.

39. FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, W. S. Características dos criatórios de bovinos da raça Curraleiro nos estados de Goiás e Tocantins. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO e SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 9 e 2.,

2008, Brasília. **Anais eletrônicos**...[on line]. Brasília: Embrapa Cerrados, 2008. Disponível em: http://www.cpac.embrapa.br/download/656/t. Acesso em: 08 out. 2011.

40. FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, V. S.; CARPIO, M. G.; COSTA, M. F. O. Conservación del bovino Curraleiro: cuantificación del censo y caracterización de los criadores. **Animal Genetic Resources**, Roma, v. 48, p. 109-116, 2011.

41. FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; McGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; MILLER, R. G.; HOLROYD, R. G. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 71, p. 39-49, 2002.

42. FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1469, p. 197-235, 2000.

43. FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, p. 176-181, 2010.

44. FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 160-170, 2011.

45. GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 34, p. 127-138, 1986.

46. GILLIAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Assesment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 103, p. 201-214, 2008.

47. GOOVAERTS, I. G. F.; HOFLACK, G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; De KRUIF, A.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 323-330, 2006.

48. GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow citometry. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 43, p. 55-64, 1990.

49. GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 47., 2001, San Diego (CA). **Proceedings**…[on line]. San Diego (CA): AAEP, 2001. p. 302-305. Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2001/91010100302.pdf. Acesso em: 25 ago. 2011.

50. GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 492-504, 2005.

51. GUIMARÃES, M. S. **Diagnóstico sorológico e avaliação da ocorrência da transmissão vertical de *Neospora caninum* nos rebanhos bovinos Curraleiro e Pantaneiro**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

52. HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1122-1136, 2006.

53. HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, Kansas, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

54. HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, p. 343-352, 1990.

55. HOLT, W. V. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development,** East Melbourne, v. 9, p. 309-319, 1997.

56. ISSA, É. C.; FIORAVANTI, M. C. S.; CARVALHO, T. B.; JORGE, W.; CAMARGOS, M. F.; SANCHES, R. L.; SERENO, J. R. B. Caracterização cromossômica de bovinos da raça Curraleira. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO e SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 9 e 2., 2008, Brasília. **Anais eletrônicos**...[on line]. Brasília: Embrapa Cerrados, 2008. Disponível em: http://www.cpac.embrapa.br/download/666/t. Acesso em: 08 out. 2011.

57. ISSA, É. C.; JORGE, W.; EGITO, A. A.; SERENO, J. R. B. Citogenetic analysis of the Y chromosome of native brazilian bovine breeds: preliminary data. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 58, n. 221, p. 93-101, 2009.

58. JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SODERQUIST, L.; HAARD, M. G. M.; HAARD, M. CH.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of diary bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 641-658, 1999.

59. JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, Kaunas, v. 17, n. 39, 2002.

60. JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, p. 743-758, 2003.

61. JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

62. JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e do sistema de fagócitos de bovinos da raça Curraleiro**. 2006. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

63. JULIANO, R. S.; MACHADO, R. Z.; FIORAVANTI, M. C. S.; ANDRADE, G. M.; JAYME, V. S. Seroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1387-1392, 2007.

64. JULIANO, R. S.; FIORAVANTI, M. C. S.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C.; SILVA, L. A. F. Proteinograma sérico de bovinos da raça Curraleiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 533-538, 2009.

65. KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective sperm motion analysis to asses dairy bull fertility using computer-aided system - A review. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, p. 165-172, 2011.

66. KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 63-67, 2007.

67. KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, London, v. 108, p. 13-15, 1981.

68. LAGERLOF, N. Morphological studies on the change in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica,** Copenhagen, v. 19, p. 254-267, 1934.

69. LOBO, J. R. **Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros Curraleiro e Nelore vacinados com *Mycobacterium bovis* – BCG**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

70. MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume,

duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 1289-1297, 2009.

71. MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: Result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 223-235, 2002.

72. MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. 2.ed. Brasília: Embrapa, 2006. 274 p.

73. MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; McMANUS, C.; LOPES, M. A.; PAIVA, S. R. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 120, p. 204-212, 2009.

74. MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAULT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 30, p. 259-266, 1990.

75. MATYUS, L.; SZABO, G. Jr.; RESLI, I.; GASPAR, R. Jr.; DAMJANOVICH, S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. **Acta Biochimica et Biophysica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 19, n. 3-4, p. 209-214, 1984.

76. MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, p. 55-65, 1996.

77. MCLAY, D. W.; CLARKE, H. J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, p. 625-633, 2003.

78. MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 327-344, 2002.

79. MENEZES, E. S. B.; OLIVEIRA, R. O.; BARBOSA, E. A.; NASCIMENTO, N. V.; RAMOS, A. F.; MOURA, A. A. A. Perfil das proteínas do plasma seminal de touros Curraleiro/Pé Duro (*Bos taurus ibericus*) - Resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19., 2011, Recife. **Anais eletrônicos**...[CD-ROM], Belo Horizonte: CBRA, 2011. p. 148.

80. MONTESINOS, I. S.; NETO, J. O. C.; DODE, M. A. N.; FIORAVANTI, M. C. S.; SERENO, J. R. B. Avaliação espermática de sêmen criopreservado de touros da raça Curraleira em banco de germoplasma: dados preliminares. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 8., 2011, Goiânia. **Anais eletrônicos**...[on line]. Goiânia: SBPC, 2011. Disponível em: http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos.htm. Acesso em: 25 ago. 2011.

81. MORAES, J. M.; BRITO, L. A. B.; MOURA, V. M. B. D.; RIBEIRO, C. S.; GUIMARÃES, V. Y.; ANDRADE, D. F.; LOBO, J. R.; FIORAVANTI, M. C. S. Inmunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça Curraleiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 339-344, 2009.

82. MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

83. MORTIMER, S. T. Casa - Practical aspects. **Journal of Andrology**, Kansas, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

84. MOURA, M. I.; TORRES, T. F.; MONTEIRO, E. P.; NEIVA, A. C. G. R.; CARDOSO, W. S.; FIORAVANTI, M. C. S. Evolução de um rebanho de bovinos Curraleiro reintroduzido em Cerrado nativo na região nordeste do estado de Goiás, Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, Córdoba, v. 1, p. 123-126, 2011.

85. MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

86. MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; PEÑA, A. I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 109, p. 27-39, 2008.

87. NEIVA, A. C. G. R.; SERENO, J. R. B.; FIORAVANTI, M. C. S. Indicação geográfica na conservação e agregação de valor ao gado Curraleiro da comunidade Kalunga. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 357-360, 2011.

88. OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability?. **Journal of Andrology**, Kansas, v. 17, n. 3, p. 183-186, 1996.

89. PAIVA NETO, M. A. Estudo da incidência e localização de carrapato (*Boophilus microplus*) em bovinos Nelore, Holandês e Curraleiro no Distrito Federal. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Circular Técnica**, 34, 2004. Disponível em: http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/175214. Acesso em: 25 ago. 2012.

90. PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, p. 859-869, 1995.

91. PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomia Histologia Embryologia**, Berlin, v. 33, p. 257-262, 2004.

92. PETRUNKINA, A. M.; GROPPER, B.; TOPFER-PETERSEN, E.; GUNZEL-APEL, A. R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 1390-1406, 2005.

93. PEZZINI, T. G.; SARTORI, R.; SILVA, T. A. S. N.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 863-868, 2006.

94. PHILLIPS, N. J.; MCGOWAN, M. R.; JOHNSTON, S. D.; MAYER, D. G. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, p. 47-61, 2004.

95. R DEVELOPMENT CORE TEAM R: A language and environment for estatistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011. Disponível em: http://www.Rproject.org/. Acesso em: 27 jun. 2011.

96. RAMOS, A. F.; NASCIMENTO, N. V.; SILVA, A. V. R.; FINO, T. C. M.; TEIXEIRA, H. C. A; DRIESSEN, K.; MARIANTE, A. S. Congelabilidade do sêmen de touros Curraleiros em diferentes épocas do ano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIÕES, 22., 2008, Guarujá. **Anais eletrônicos**...[on line]. Porto Alegre: UFRGS, 2008. p. 546. Disponível em: http://www.ufrgs.br/actavet/36-suple-2/FINAL ANAIS da XXII Reuniao da SBTE 2008.pdf. Acesso em: 15 ago. 2012.

97. RANGEL, P. N.; ZUCCHI, M. I.; FERREIRA, M. E. Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 97-100, 2004.

98. RAO, A. R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B. K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 14, p. 1-12, 1980.

99. RATH, D.; TOPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, H. W.; SCHWARTZ, P.; EBELING, S. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of *in vivo* and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 352-362, 2005.

100. ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDES, C.; COX, J. F. Casa assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 393-399, 2008.

101. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos...**[CD-ROM], Belo Horizonte: CBRA, 2005.

102. RUBIN, M. I. B. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (1985-2005). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, supl. 1, p. 35-54, 2005.

103. SAACKE, R. G.; DeJARNETTE, J. M.; BARNE, J. H.; KARABINUS, D. S.; WHITMAN, S. S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super and single ovulating cattle?. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p. 117-128, 1998.

104. SAACKE, R. G.; DALTON, J. C.; NADIR, S.; NEBEL, R. L.; BAME, J. H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 663-677, 2000.

105. SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 473-478, 2008.

106. SALLES, P. A.; MEDEIROS, G. R.; COSTA, R. G.; RAMOS, C. T. C.; BORBUREMA, J. B.; ALMEIDA, M. J. O.; ROCHA, L. L. R.; WELLER, M. Programa de conservação e melhoramento de uma raça bovina brasileira: Curraleiro (Pé Duro). **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, Córdoba, v. 1, p. 453-456, 2011.

107. SALLES, P. A.; BARBOSA, V. V.; RAMOS, C. T. C.; BORBUREMA, J. B.; MEDEIROS, G. R.; WELLER, M. Crescimento corporal e testicular do nascimento aos 12 meses de idade em bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 9., 2012, João Pessoa. **Anais eletrônicos**...[on line]. João Pessoa: SBMA, 2012. Disponível em: http://sbmaonline.org.br/sbma2012/busca/pdf/4TBX.pdf. Acesso em: 05 set. 2012.

108. SANTIN, A. P. I. **Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica**. 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

109. SARTORIO, S. D. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários usando o software R**. 2008. 131 f. (Dissertação em Estatística e Experimentação agronômica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

110. SERRANO, G. M.; EGITO, A. A.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 543-549, 2004.

111. SERRANO, G. M.; EGITO, A. A.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Genetic population structure of brazilian bovine breeds inferred by RAPD markers. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 54, n. 206-207, p. 409-414, 2005.

112. SETCHELL, B. P. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 114, p. 179-194, 1998.

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

114. SOUSA, A. P. F.; FRENEAU, G. E.; FIORAVANTI, M. C.; JULIANO, R. S. Estudo da espermatogênese pelo sêmen e a morfologia testicular do Gado Pé Duro. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 1., 2004, Goiânia. **Anais eletrônicos**...[on line]. Goiânia: UFG, 2004. Disponível em: http://www.ufg.br/conpeex/2004/pibic/agro/AnaPaula.html. Acesso em: 05 ago. 2012.

115. TANGUE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; De KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, p. 127-132, 2002.

116. TEIXEIRA, H. C. A.; MARIANTE, A. S.; NASCIMENTO, N. V.; SILVA, A. V. R.; FINO, T. C. M.; EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; RAMOS, A. F. Monitoramento da qualidade do sêmen de bovino Crioulo Lageano estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIÕES, 22., 2008, Guarujá. **Anais eletrônicos**...[on line]. Porto Alegre: UFRGS, 2008. p. 547. Disponível em: http://www.ufrgs.br/actavet/36-suple-2/FINAL ANAIS da XXII Reuniao da SBTE 2008.pdf. Acesso em: 15 ago. 2012.

117. TEIXEIRA, H. C. A. **Diferentes protocolos com progesterona na resposta superestimulatória e produção embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé Duro**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

118. TEIXEIRA, H. C. A.; NASCIMENTO, N. V.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; RAMOS, A. F. Sazonalidade reprodutiva em touros Curraleiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais eletrônicos**...[online]. Belo Horizonte: CBRA, 2009. Disponível em: http://www.cbra.org.br/pages/eventos/cbra18/Posters.pdf. Acesso em: 26 ago. 2012.

119. TEIXEIRA, H. C. A; NASCIMENTO, N. V.; McMANUS, C.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; RAMOS, A. F. Seasonal influence on semen traits and freezability from locally adapted Curraleiro bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, p. 56-61, 2011.

120. THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 45, p. 235-242, 2005.

121. THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DeJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, p. 786-793, 1998.

122. VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 149-179, 2002.

123. WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

124. WIJCHMAN, J. G.; DE WOLF, B. T. H. M.; GRAAFF, R.; ARTS, E. G. J. M. Variation in semen parameters derived from computer-aided semen analysis, within donors and between donors. **Journal of Andrology**, Kansas, v. 22, n. 5, p. 773-780, 2001.

125. YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

126. ZHOU, Q.; GRISWOLD, M. D. Regulation of spermatogonia. In: MELTON, D. A. **Stembook**. [online]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27035. Acesso em: 25 ago. 2011.

ANEXOS

Anexo 1. Dose espermática, doador, origem e partidas de sêmen Curraleiro/Pé Duro

DOSE TOURO	TOURO DOADOR	ORIGEM DOADOR		PARTIDA SÊMEN
		MATERNA	PATERNA	
DT1	1125 Roxinol	DF		P01
DT2	1011	MG	PI	P5
DT3	311	MG		P2/01
DT4	308	MG		P07
DT5	Buriti 345	PI		P03
DT6	Bacurau 346	PI		P03/94
DT7	Veterano 01	GO		P01
DT8	Tarado	GO		27/09/2006
DT9	1218	DF		P4/08
DT10	1210	DF		P5/07
DT11	306	MG		P04
DT12	9905	PI	GO	P03/03
DT13	9808	MG	GO	P2/1
DT14	Paulista 193	PI		P3
DT15	Cristiano 349	PI		P2/01
DT16	Riachão 335	PI		P06
DT17	Sarney	GO		P02/01
DT18	745528	GO		P03/07
DT19	Lula	GO		P9/96
DT20	1223	DF		P4/07
DT21	1016	DF		P03/3

DF (Distrito Federal), MG (Minas Gerais), PI (Piauí), GO (Goiás)

Anexo 2. Percentuais dos espermatozóides normais (NRM) e defeitos morfológicos da cabeça espermática

DOSE TOURO	NRM	CBIS	CBISPT	CBDL	CBDLNB	CBPF	CBGG	CBSBD	DUCB	CRTR	DDM	KBB	ACRVS	ACRRG	CTANR	TRTL
DT1	60.19	2.31	2.31	1.85	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	21.76	0.00	0.00	0.00	0.00	5.56	2.78
DT2	88.00	4.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.50	0.50	0.00	1.00	0.50
DT3	86.00	4.00	1.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	0.50
DT4	82.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.50	0.50	0.00	1.00	1.00
DT5	84.50	0.50	0.00	0.00	0.50	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.50	0.00	0.00	1.50
DT6	92.50	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT7	70.71	1.52	0.00	0.00	0.00	3.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.02	0.00	0.00	1.01	0.00
DT8	88.61	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00	0.00	0.50
DT9	79.50	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	0.50
DT10	37.50	7.50	3.00	5.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50	2.50
DT11	88.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.00	0.50	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
DT12	95.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00
DT13	82.59	1.99	0.00	0.00	0.50	0.50	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	1.00	0.00	0.50	1.00	1.00
DT14	93.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	1.00	0.50	0.50
DT15	84.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.43	0.00	0.95	0.00	0.00	0.48	1.43
DT16	76.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.50	0.00	1.50	0.00	9.00	0.00	0.00	0.00	1.00	2.50	3.00
DT17	68.23	1.04	0.52	0.00	2.08	1.04	0.00	0.00	0.00	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.04
DT18	90.50	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT19	90.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	1.50
DT20	77.50	2.50	0.50	0.00	2.00	6.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00
DT21	88.50	2.00	0.50	0.00	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00	1.00

NRM (normais). Defeitos da cabeça: CBIS (cabeça isolada), CBISPT (cabeça isolada patológica), CBDL (cabeça delgada), CBDLNB (cabeça delgada na base), CBPF (cabeça piriforme), CBGG (cabeça gigante), CBSBD (cabeça subdesenvolvida), DUCB (duas cabeças), CRTR (cratera), DDM (diadema), KBB (knobbed), ACRVS (acrossoma vesiculoso), ACRRG (acrossoma rugoso), CTANR (contorno anormal), TRTL (cabeça teratológica)

Anexo 3. Percentuais dos defeitos morfológicos da cauda espermática (peça intermediária e peça principal ou flagelo)

DOSE TOURO	FIBR	FRTPI	GTDT	GTPRX	AGNPI	INSCABX	CDFTDB	CDFTEN	CDFTDBGT	CDDB	CDDBABX	CDEN	CDENCB	DUCD
DT1	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.46	0.93	0.00	0.00	0.46	0.00
DT2	0.00	0.00	1.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00
DT3	0.00	0.00	0.00	2.00	0.50	0.00	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	1.00
DT4	2.00	1.00	0.00	0.50	0.00	0.00	2.50	1.00	1.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00
DT5	2.00	0.00	2.50	0.50	0.00	0.00	2.50	1.00	1.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00
DT6	0.00	2.00	0.00	0.50	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00
DT7	0.51	3.03	2.02	1.01	0.51	1.52	4.04	2.02	7.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT8	0.00	0.99	1.49	2.48	0.00	0.00	2.48	0.00	0.00	0.00	0.99	0.00	0.00	0.50
DT9	1.00	1.50	1.50	3.50	0.00	0.00	2.00	1.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT10	1.00	2.50	0.50	19.00	0.50	0.50	0.00	0.00	6.50	0.00	1.00	8.00	2.50	0.00
DT11	0.00	1.00	3.00	0.50	0.00	0.00	1.00	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT12	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.00
DT13	1.00	0.50	1.00	0.50	0.50	0.00	2.99	0.50	0.00	0.50	0.00	2.49	0.00	0.00
DT14	0.50	0.50	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT15	0.48	0.00	0.95	0.00	0.00	0.95	0.95	4.76	1.90	0.48	0.00	0.95	0.00	0.00
DT16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	3.50	1.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00
DT17	0.52	1.04	1.56	0.52	1.56	0.00	3.65	0.00	15.10	0.00	1.04	0.00	0.52	0.00
DT18	0.00	1.00	0.00	2.50	0.50	0.00	2.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT19	0.50	0.00	3.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DT20	0.50	1.00	2.50	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00
DT21	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	1.50	1.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00

Defeitos peça intermediária: FIBR (fibrilação), FRTPI (fratura peça intermediária), GTDT (gota distal), GTPRX (gota proximal), AGNPI (agenesia peça intermediária). Defeitos flagelo: INSCABX (inserção cauda abaxial), CDFTDB (cauda fortemente dobrada), CDFTEN (cauda fortemente enrolada), CDFTDBGT (cauda fortemente dobrada com gota), CDDB (cauda dobrada), CDDBABX (cauda dobrada abaxial), CDEN (cauda enrolada), CDENCB (cauda enrolada na cabeça), DUCD (duas caudas)

Anexo 4. Percentuais da cinética espermática

DOSE TOURO	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	RPD
DT1	53.00	29.00	75.60	59.60	131.30	6.50	28.20	79.00	47.00	40.00
DT2	51.00	28.00	63.80	52.40	104.40	5.50	26.90	82.00	51.00	35.00
DT3	48.00	29.00	65.60	54.10	109.10	5.50	26.30	82.00	52.00	34.00
DT4	48.00	30.00	72.10	59.40	117.30	5.60	30.70	82.00	52.00	38.00
DT5	59.00	45.00	105.60	88.40	179.20	6.70	36.10	83.00	52.00	55.00
DT6	49.00	33.00	79.00	64.40	130.20	5.80	30.80	80.00	50.00	41.00
DT7	44.00	26.00	76.20	59.70	127.70	5.90	30.70	79.00	51.00	36.00
DT8	46.00	14.00	67.70	44.30	118.50	7.30	20.40	67.00	39.00	30.00
DT9	67.00	40.00	62.30	52.40	103.50	5.10	27.80	84.00	52.00	48.00
DT10	28.00	15.00	59.40	51.90	98.30	5.00	34.20	87.00	55.00	17.00
DT11	43.00	31.00	88.70	72.10	156.90	6.70	29.60	80.00	48.00	38.00
DT12	40.00	17.00	57.00	44.00	101.90	6.40	18.60	78.00	46.00	25.00
DT13	48.00	37.00	77.70	66.70	123.20	5.30	31.50	85.00	55.00	41.00
DT14	41.00	23.00	70.30	52.70	133.90	7.60	22.40	75.00	41.00	33.00
DT15	44.00	31.00	74.20	60.70	136.10	6.30	30.70	81.00	46.00	36.00
DT16	59.00	39.00	71.60	59.40	117.80	5.50	29.80	83.00	53.00	47.00
DT17	44.00	20.00	54.90	43.30	95.50	5.70	19.50	79.00	47.00	26.00
DT18	13.00	9.00	69.60	59.20	120.60	6.20	24.50	83.00	50.00	11.00
DT19	58.00	31.00	87.20	60.90	168.40	7.70	23.60	70.00	38.00	51.00
DT20	22.00	13.00	76.90	61.10	130.20	6.30	30.80	78.00	47.00	17.00
DT21	49.00	34.00	91.30	75.00	156.50	6.80	30.90	81.00	49.00	44.00

MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva), VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear), ALH (amplitude de batimento da cabeça), BCF (freqüência de batimento da cauda), STR (retilinearidade), LIN (linearidade), RPD (células rápidas)

Anexo 5. Percentuais de integridade da membrana plasmática e do acrossoma

DOSE TOURO	MPL	MPSL	MPI	DOSE TOURO	SMAI	SMAR	SVAI	SVAR
DT1	56.00	9.00	35.00	DT1	22.82	34.95	40.78	1.46
DT2	37.91	23.08	39.01	DT2	32.00	49.00	18.00	1.00
DT3	35.50	24.00	40.50	DT3	38.00	25.50	35.50	1.00
DT4	56.58	8.77	34.65	DT4	20.50	45.50	33.50	0.50
DT5	48.50	16.00	35.50	DT5	35.68	27.64	36.68	0.00
DT6	52.27	18.64	29.09	DT6	39.50	29.50	31.00	0.00
DT7	53.11	9.57	37.32	DT7	29.67	34.93	34.93	0.48
DT8	58.29	12.32	29.38	DT8	41.84	31.80	26.36	0.00
DT9	33.50	17.00	49.50	DT9	33.00	21.50	45.50	0.00
DT10	61.00	24.00	15.00	DT10	59.50	28.00	12.50	0.00
DT11	62.50	5.00	32.50	DT11	25.62	33.00	39.41	1.97
DT12	42.50	22.00	35.50	DT12	40.00	25.00	33.00	2.00
DT13	57.71	12.44	29.85	DT13	25.86	37.93	34.91	1.29
DT14	60.63	18.10	21.27	DT14	25.00	53.00	21.50	0.50
DT15	36.20	14.93	48.87	DT15	33.50	16.00	48.50	2.00
DT16	32.00	15.00	53.00	DT16	29.50	20.00	50.50	0.00
DT17	43.60	3.79	52.61	DT17	11.00	43.50	31.00	14.50
DT18	64.00	25.50	10.50	DT18	45.00	45.50	9.50	0.00
DT19	12.00	12.50	75.50	DT19	18.00	5.50	76.00	0.50
DT20	40.87	30.87	28.26	DT20	54.00	23.50	22.00	0.50
DT21	41.00	20.50	38.50	DT21	44.50	22.50	33.00	0.00

Integridade da membrana plasmática: MPL (membrana plasmática lesada), MPSL (membrana plasmática semi-lesada), MPI (membrana plasmática íntegra). Integridade do acrossoma: SMAI (espermatozóide morto acrossoma íntegro), SMAR (espermatozóide morto acrossoma reagido), SVAI (espermatozóide vivo acrossoma íntegro), SVAR (espermatozóide vivo acrossoma reagido)

Anexo 6. *Setup* do Hamilton Thorne Bioscience (IVOS – Ultimate 12)

* Característica	Ajuste
* Captura de imagens	
Número de imagens adquiridas por campo	30
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
* Detecção da célula	
Contraste mínimo da célula	80
Tamanho mínimo da célula	5 pix
* Células progressivas	
Velocidade de trajeto (VAP)	50,0 µm/s
Retilinearidade (STR)	70%
* Valor de corte VSL para células lentas	10 µm/s
* Padrão	
Tamanho da célula	5 pix
Intensidade da célula	70
* *Setup* óptico	
Intensidade	2000 – 220
Fotômetro	50 – 55
* Tipo de câmara	Makler
* Temperatura	37 °C
* Seleção de campos	Manual