

AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS DA RAÇA CURRALEIRA EM BANCO DE GERMOPLASMA: DADOS PRELIMINARES

Iván Salamanca MONTESINOS; José de Oliveira Carvalho NETO; Margot Alves Nunes DODE; Maria Clorinda Soares FIORAVANTI; José Robson Bezerra SERENO

Palavras-chave: touros, preservação, recursos genéticos animais, raças crioulas

INTRODUÇÃO

O gado Curraleiro também chamado Pé Duro, é uma raça originária dos bovinos (*Bos taurus ibericus*) trazidos pelos colonizadores portugueses no século XVI (MARIANTE & EGITO (2002)). Esta e outras raças seculares foram submetidas à constante seleção natural e adaptação por mais de 400 anos, sendo um verdadeiro tesouro genético para a pecuária tropical brasileira, pela sua extrema rusticidade, resistência ao calor, doenças e parasitas, além de aproveitar eficientemente pastagens de baixa qualidade (MARIANTE et al. 2009).

Segundo MARIANTE & EGITO (2002), ao final do século XIX e começos do XX, no Brasil começou-se a importar raças especializadas, com maior desempenho zootécnico que os bovinos locais, sendo o Curraleiro substituído por cruzamentos absorventes e descartado dos rebanhos, o que quase causou seu desaparecimento.

Graças a esforços da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) em parceria com associações de criadores, universidades e outras instituições, esta raça se encontra livre do perigo de extinção, formando núcleos de conservação em regiões como o Centro Oeste e Nordeste brasileiro (DINIZ, 2005).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar doses de sêmen de touros Curraleiros, mensurando seu potencial reprodutivo mediante exames de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF.

O material utilizado foi gentilmente cedido pela Curadoria do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), que doou algumas palhetas de sêmen de 22 reprodutores da raça Curraleira. Avaliou-se no laboratório a morfologia e motilidade espermática, assim como a integridade de membrana plasmática e de acrossoma.

A morfologia espermática foi avaliada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200), em preparação úmida, sob imersão e aumento de 1000x, conforme BARTH & OKO (1989). Foram consideradas patologias de acrossoma, cabeça e cauda (peça intermediária e principal), realizando a contagem de 200 células e os resultados expressos em porcentagens de espermatozoides normais e patológicos.

A motilidade espermática foi avaliada pelo Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), colocando uma amostra de sêmen (10 μ L) na câmara de Makler, ajustando o aparelho IVOS-Ultimate 12 para análise de sêmen bovino e selecionando três campos de leitura. Parâmetros mensurados: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, μ m/s); velocidade retilínea (VSL, μ m/s); velocidade curvilínea (VCL, μ m/s); amplitude lateral de cabeça (ALH, μ m); frequência de batimentos (BCF, Hz); retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

A integridade de membrana plasmática e de acrossoma foram avaliadas com microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss), sob imersão e aumento de 40x. Num ependorf protegido da luz se misturou 480 μ L de citrato de sódio a 3%, 5 μ L de formol a 1,6% e 5 μ L de iodeto de propídeo (IP). A essa preparação se agregou 10 μ L de diacetato carboxifluoresceína (C-FDA), para obter a solução corante da membrana plasmática (SCMP), conforme HARRISON & VICKERS (1990), ou se agregou 10 μ L de lecitina de amendoim (PNA), para obter a solução corante da membrana acrossomal (SCMA), conforme KLINC & RATH (2007).

Foram retirados 30 μ L de solução corante (SCMP ou SCMA), onde se diluiu uma amostra de sêmen (10 μ L). Após diluição, uma alíquota de 10 μ L foi extraída e colocada sobre lâmina, coberta com lamínula, para posterior busca no microscópio, realizando a contagem de 200 células, e os resultados expressos em porcentagens, segundo a seguinte classificação: membrana plasmática (íntegra, cabeça cor verde; semi-lesada, cabeça cor verde e vermelho; lesada, cabeça cor vermelho) e membrana acrossomal (espermatozóide morto com acrossoma íntegro, cabeça cor vermelho e acrossoma sem cor; espermatozóide morto com acrossoma reagido, cabeça cor vermelho e acrossoma cor verde; espermatozóide vivo com acrossoma íntegro, cabeça e acrossoma sem cor; espermatozóide vivo com acrossoma reagido, cabeça sem cor e acrossoma cor verde).

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas Excel e processados através de estatística descritiva simples.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na morfologia espermática, observou-se que as médias das anormalidades apresentadas na estrutura dos espermatozóides foram baixas ($\leq 2,37\%$). Estas anomalias classificaram-se segundo a localização, sendo as médias mais altas: na cabeça (isolada 1,51%; cratera 1,96%; teratológica 1,03%) e na cauda (gota proximal 1,72%; gota distal 1,02%; fortemente dobrada 1,76%; fortemente dobrada com gota 2,37%).

No referente à taxa mínima de espermatozóides normais (70%), exigida pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998) no sêmen descongelado dum reprodutor, o grupo dos 22 touros obteve uma média aceitável (80,96%), e um desvio padrão (DP) de 12,99%. Foram três touros os que não cumpriram com essa norma, quais sejam: Sarney (68,23%); T1125 Roxinol (60,19%); T1210 (37,50%). Tendo como patologias de maior incidência: Sarney, cauda fortemente dobrada com gota (15,10%); T1125, cratera (21,76%) e T1210, gota proximal (19,00%).

Vale salientar as altas taxas de espermatozóides anormais e gota proximal encontradas no reprodutor T1210, que sugerem problemas de maturidade sexual, de epidídimo, assim como baixa fertilidade (RAO et al., 1980).

A motilidade espermática total (MT) teve como média geral nos 22 touros (45,64%) um valor aceito pelo CBRA (1998), que exige como mínimo 30% para o sêmen descongelado dum reprodutor, além disso, o DP foi de 12,17%. Houve diferenças na média individual, onde três touros alcançaram valores inferiores à norma na MT e também tiveram baixas taxas na Motilidade Progressiva (MP): T1210 (MT 28%; MP 15%); T745528 (MT 13%; MP 9%) e T1223 (MT 22%; MP 13%).

Nos outros parâmetros avaliados por meio do CASA, o touro Lula demonstrou espermatozóides com indícios de Hiperatividade (HA) prematura, porque alcançou simultaneamente: valores de velocidade (VAP, VSL e VCL) altos, o ALH (7,70 μ m) foi superior a 7 μ m, o STR era de 70%, um dos menores no grupo, sendo ótimo 100%, e somado a isso, 38% de LIN (ideal > 50%). Esta HA conduz a movimentos vigorosos e desordenados, com batimentos flagelares assimétricos, provocando progressão espermática de trajetória irregular e curva. Situação indesejada, já que deveria ocorrer próxima ao local de fertilização, essa ativação precoce determinará um menor tempo de vida útil do espermatozóide, reduzindo a capacidade fecundante do animal (VERSTEGEN et al., 2002).

Também se observou que o touro T9808 com MT aceitável, e o touro T1210 com MT inferior ao padrão, amostraram o BCF alto e o ALH baixo, características que em conjunto se relacionam com a boa capacidade do espermatozóide em penetrar o muco cervical da fêmea. Além disso, os touros tiveram altos valores STR e LIN, o que denota boa movimentação retilínea, favorecendo o trânsito através do útero e a fecundação (MORTIMER, 1997).

Nos exames de fluorescência que avaliaram a integridade de membrana plasmática e de acrossoma, os parâmetros mais importantes e relacionados fisiologicamente, foram membrana plasmática íntegra (MPI) e espermatozóides vivos com acrossoma íntegro (EVAI), os quais alcançaram como média geral e DP: MPI (35,17%; 15,64) e EVAI (35,50%; 15,74%). Nestes parâmetros, os touros com os valores mais baixos no grupo foram ($\leq 15\%$): T1210 (MPI 15,00%; EVAI 12,50%); T745528 (MPI 10,50%; EVAI 9,50%) e T593 (MPI 2,38%; EVAI 1,00%).

O touro T593 revelou sérios problemas espermáticos, já que obteve valores demasiado baixos. Procuram-se sempre altas porcentagens nestes exames porque refletem a boa conformação estrutural e funcionalidade da célula, o que correlaciona com altas taxas de gestação (PHILLIPS et al., 2004).

Finalmente, ao comparar resultados dos diferentes exames espermáticos, encontraram-se algumas controvérsias, tais como: o touro T1210, que foi inferior nos quatro exames, mas segundo parâmetros complementares obtidos por meio do CASA, seus espermatozóides teriam boa penetração e movimento através do útero, provocando uma maior chance de fecundação. O touro T745528, inferior na MT e exames de fluorescência, teve alta taxa de espermatozóides normais (90,50%). E o touro T593, que alcançou as mais baixas taxas na fluorescência, possuía taxas aceitáveis de espermatozóides normais (77,51%) e MT (50%).

CONCLUSÕES

Sabe-se que nenhum teste isoladamente é capaz de mensurar o potencial de fertilidade dum ejaculado, sendo evidenciada nesta pesquisa a necessidade de combinar múltiplos exames para obter uma informação confiável, mas a pesar disso alguns touros após criopreservação apresentaram problemas espermáticos morfofuncionais para algumas características e bom desempenho em outras, sendo interessante confirmar os resultados, com testes de fecundação *in vitro*, ferramenta que forneceria uma maior acurácia do potencial reprodutivo de cada animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Iowa; Ames, 1989. 1º ed., 285 p.
2. CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte; CBRA, 1998. 2º ed., 49 p.
3. DINIZ, F. Imprensa Noticias Setembro 2005. Instituições se unem para salvar gado Curraleiro da extinção. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br>. Acesso em: 24 abr. 2011.
4. HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 88, p. 343-352, 1990.
5. KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 42, p. 63-67, 2007.
6. MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: Result of five centuries of natural selection. **Theriogenology.** v. 57, p. 223-235, 2002.
7. 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.** v. 120, p. 204-212, 2009.
8. MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update.** v. 3, nº 5, p. 403-439, 1997.
9. 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.** v. 81, p. 47-61, 2004.
10. 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.** v. 14, p. 1-12, 1980.
11. VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology.** v. 57, p. 149-179, 2002.