

## Evaluación andrológica de reproductores bovinos de razas naturalizadas brasileñas<sup>1</sup>

Dode, M.A.N.<sup>1</sup>; Silva, T. A.S. N.<sup>1</sup>; Melo, N. S.S.<sup>1</sup>; Martins, C.F.<sup>1,2</sup>

### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo realizar evaluación andrológica en toros de razas naturalizadas brasileñas y evaluar las características seminales después de la criopreservación. Fueron utilizados animales de las razas Pantaneira, Junqueira, Crioulo Lageano, Mocho Nacional y Curraleira. La motilidad individual y en masa, vigor y porcentaje de células con cromatina íntegra fue semejante para todos los animales. Con excepción de los animales de las razas Pantaneira y Curraleira, los demás presentaron características seminales fuera del patrón recomendando para el congelamiento. Para evaluar el efecto del congelamiento en el semen, fueron utilizados dos reproductores de la raza Curraleira. Todos los animales presentaron descenso en la motilidad individual y vigor en el poscongelación y un aumento en el porcentaje de células anormales, no habiendo alteraciones en la integridad de la cromatina. La reducción en el porcentaje de células vivas con acrosoma íntegro poscongelación, fue más acentuada en el semen de los toros de la raza Curraleira, que en el control. Una variación, fue también observada en las tasas de clivaje y blastocisto, siendo las menores tasas obtenidas cuando el semen de animales de la raza Curraleira fue utilizado. Los resultados indican que la evaluación de las características estructurales y funcionales de los espermatozoides posdescongelación debe ser realizada en todas las partidas de semen que serán utilizadas en la formación de bancos de germoplasma.

**Palabras clave:** semen, fertilidad, conservación, razas nativas, crió preservación.

### SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate andrological characteristics of bulls from Brazilian native breed and to verify the effect of cryopreservation on semen parameters. Animals from Pantaneira, Junqueira, Crioulo Lageano, Mocho Nacional and Curraleira breeds were utilized. Individual and in mass motility, and percentage of cell with intact chromatin, were similar for all animals. Except the animals from Pantaneira and Curraleira breeds, the remained showed seminal characteristics beyond the parameters recommended for cryopreservation. To evaluate the effect of freezing on semen characteristics, two males from Curraleira breed were used. All animals showed a decrease in overall and individual motility and an increase in the percentage of abnormal cells, after thawed. No changes in chromatin integrity were observed. The decrease in the percentage of cells alive and with intact acrosome after thawed was higher in the samples from bulls of the Curraleira breed than in the control bull. A variation was also observed in the cleavage and blastocyst rates, being the lowest rates obtained with semen from Curraleira animals. The results suggested that the structural and functional evaluation of the sperm cells after cryopreservation has to be done in all semen samples used to form a germplasm bank.

**Key words:** semen, fertility, conservation, native breeds, cryopreservation

### INTRODUCCIÓN

Brasil posee una grande variedad de razas naturalizadas u autóctonas, que se desarrollaron a partir de aquéllas traídas por los colonizadores portugueses, enseguida al descubrimiento del país. Sin embargo, con la llegada de otras más productivas, las razas naturalizadas fueron poco a poco, siendo sustituidas por las exóticas, haciendo con que muchas de ellas hoy encuentrense amenazadas de extinción (11,12).

Esas razas sufrieron un proceso de selección natural, durante casi cinco siglos,

en condiciones ambientales específicas, de tal forma que hoy presentan alta adaptabilidad a determinadas condiciones, resistencia a enfermedades y excepcional rusticidad (11), constituyéndose en un patrimonio genético ímpar, que debe ser mantenido y preservado. La conservación de esos recursos genéticos animales, por lo tanto, es una cuestión prioritaria no-solo por su carácter histórico, pero también por serien una de las grandes fuentes de riqueza del país (19).

Con el advenio de las biotécnicas de la reproducción asistida y biología mole-

cular, se ha tornado posible preservar e multiplicar estos animales, de forma que, en el futuro, genes de importancia económica posan ser utilizados para incrementar la producción animal y/o atender a demandas específicas (20).

La criopreservación del gameto masculino es el primer paso para la conservación de germoplasma, por ser una técnica totalmente dominada, y de costes relativamente bajo. Sin embargo, antes de se preservar es necesario conocer el material que será almacenado. Con relación a los gametos masculinos, es necesario

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica Final Av. W5 Norte, Brasília, DF, 70.770, Brasil. E-mail: margot@cenargen.embrapa.br.

<sup>2</sup>Universidade de Brasília.

se tener una estimativa cuanto a fertilidad del donante, para que esos poseen, en el futuro, serien utilizados de la forma más adecuada y con mayor seguridad. Por lo tanto, una evaluación de los reproductores es fundamental antes de criopreservar el semen que será utilizado en la formación de bancos de germoplasma. Pues, más importante que preservar es saber que tipo de material está siendo preservando, siendo necesario recolectar el máximo de informaciones posibles. Principalmente, en se tratando de razas naturalizadas, pues datos relacionadas a las características reproductivas son prácticamente inexistentes en la literatura brasileña.

El objetivo de esto estudio fue realizar evaluación andrológica de reproductores de razas naturalizadas brasileñas, así como evaluar las características seminales físicas y funcionales delante del proceso de criopreservación. El conocimiento de los aspectos reproductivos de esos animales es fundamental para proporcionar un mejor aprovechamiento de los mismos en programas de conservación y preservación de especies amenazadas de extinción.

## MATERIALES E MÉTODOS

Ese estudio fue realizado en la Granja Experimental Sucupira de Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología, en Brasília, DF, Brasil. Fueron utilizados animales de cada una de las siguientes razas naturalizadas brasileñas: Pantaneira, Junqueira, Crioulo Lageano, Mocho Nacional y Curraleira, con edad variando de tres a ocho años, pertenecientes al Banco Brasileño de Germoplasma Animal da Embrapa.

Inicialmente fue realizada la evaluación andrológica de cinco toros, un de cada raza. Fueron realizados tres exámenes andrológicos con intervalo de 15 días. En el examen externo fueron realizadas la circunferencia escrotal, la longitud, la anchura y la consistencia testicular, utilizándose cinta métrica y parquímetro. Las recolectas de semen fueron realizadas con auxilio de un electroeyaculador.

Inmediatamente, en el post-extracción seminal fue evaluado cuanto la motilidad en masa (1-5), motilidad individual (0-100%) y vigor espermático (0-5). Fue-

ron acondicionadas muestras en formalina, para posterior determinación de la concentración y morfoanomalía espermática, además de la integridad de la cromatina.

La concentración fue determinada a través de recuento de células en una cámara de Neubauer. Para la morfología espermática, fueron hechas preparaciones húmedas en portaobjetos y evaluadas en microscopio de contraste de fase, contándose un total de 200 células.

La integridad de la cromatina fue determinada utilizándose la técnica de tinción con *acridine orange* (21). De las muestras de semen hizo improntas, que fueron fijadas y corados con *acridine orange*. Los portaobjetos fueron analizados en microscopio de epifluorescencia, siendo contadas 200 células. Fueron considerados con cromatina intacta los espermatozoides colorados en verde y con cromatina danificada los colorados en amarillo u naranja.

Para evaluación del efecto de la congelación en las características seminales de animales de razas naturalizadas fueron utilizados dos (2) sementales de la raza Curraleira y un (1) semental de la raza Nelore (control) que presentaban características físicas del semen semejantes.

Los animales fueron sometidos a extracciones seminales, de acuerdo con lo descrito anteriormente y el semen sometido a criopreservación. La congelación del semen fue realizado con el medio de congelamiento tris-gema, utilizándose glicerol como crioprotector (13). Todos los análisis físicos y morfológicas del semen fueron realizados pre y poscongelación. Además de los análisis ya mencionados, fue también realizada una evaluación de la integridad del acrosoma.

La evaluación de la integridad del acrosoma fue realizada utilizando una tinción doble (tinción *trypan-blue*/Giemsa) de acuerdo con el descrito por Feliciano Silva (5). Inmediatamente post-recolecta y posdescongelación, una muestra de semen fue incubada con *trypan-blue*, y después de fijadas coradas con Giemsa. Estas improntas fueron evaluadas en microscopía de campo claro con recuento de 200 células, considerándose vivos los espermatozoides con acrosoma intacto que no se colorearon (blanco u ce-

niza/castaño-claro), mientras que los espermatozoides muertos con acrosoma desintegrado tenían una coloración de rosa-claro/rojo.

Para evaluar la capacidad fecundante del semen de animales de razas naturalizadas, poscongelación y la posibilidad de utilizarlos para la producción in vitro de embriones (PIV) se utilizó de semen de dos animales de la raza Curraleira y un animal de la raza Nelore (semen control), criopreservados en el experimento anterior.

Se utilizó un total de 441 ovocitos madurados y fecundados in vitro en tres repeticiones, utilizándose el protocolo de PIV recomendado por el laboratorio de reproducción animal de Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología (16). Ovarios de vacas mestizas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) fueron recolectados luego después del abate y los complejos cúmulos ovocitos (COCs) fueron aspirados, de folículos de dos a ocho mm de diámetro, con aguja de 18 G y con auxilio de una bomba a vacío. Los COCs seleccionados fueron transferidos para el medio de maduración y incubados por 22 h. Después de la maduración los COCs fueron transferidos para el medio de fecundación.

Simultáneamente, en cada una de las tres repeticiones, se utilizó de semen congelado de los tres toros. Para selección de los espermatozoides el semen fue sometido a un gradiente de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) (15) y entonces adicionado en las gotas de fecundación (14) con una concentración final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Espermatozoides y ovocitos fueron co-incubados por 22 h.

Después de la co-incubación, los supuestos cigotos fueron transferidos para el medio de cultivo embrionario, SOF aaci (8). Los embriones fueron evaluados 44 horas posinseminación para tasa divisiones celulares (clivage) y siete días posinseminación para la tasa de blastocisto. Los datos referentes a la producción de embriones "in vitro" fueron analizados pelo teste do Chi-cuadrado.

## RESULTADOS

Se puede observar que todos los animales presentaron circunferencia escrotal arriba de 30 cm (Cuadro 1). La evalua-

**Cuadro 1.** Características testiculares evaluadas a través del examen andrológico de bovinos de razas naturalizadas brasileñas (promedio de tres extracciones seminales).

| Raza           | Circunferencia | Anchura                | Longitud               | Anchura                | Longitud               | Consistencia     |
|----------------|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------|
|                | escrotal (cm)  | T.D. <sup>1</sup> (mm) | T.D. <sup>1</sup> (mm) | T.D. <sup>2</sup> (mm) | T.D. <sup>2</sup> (mm) | Testicular (1-5) |
|                | X ± dt         | X ± dt                 | X ± dt                 | X ± dt                 | X ± dt                 | X ± dt           |
| Pantaneira     | 32,6 ± 0,6     | 75,6 ± 0,6             | 120,6 ± 0,0            | 74,6 ± 0,6             | 130,0 ± 0,0            | 2 ± 0            |
| Junqueira      | 38,3 ± 0,6     | 74,3 ± 0,6             | 128,6 ± 1,5            | 68,6 ± 1,5             | 129,3 ± 0,6            | 2 ± 0            |
| Criolo lageano | 33,0 ± 0,0     | 84,3 ± 1,1             | 139,3 ± 1,6            | 70,0 ± 0,0             | 139,6 ± 0,6            | 3 ± 0            |
| Mocho nacional | 34,0 ± 0,0     | 68,3 ± 0,6             | 149,3 ± 1,5            | 65,3 ± 0,6             | 150,0 ± 1,0            | 2 ± 0            |
| Curraleira     | 30,3 ± 0,6     | 64,6 ± 0,6             | 150,6 ± 1,1            | 61,0 ± 1,0             | 120,6 ± 1,1            | 2 ± 0            |

<sup>1</sup>Testículo derecho

<sup>2</sup>Testículo Izquierdo

X = promedio y dt = desviaciones típicas

ción de las características seminales mostró que la motilidad en masa, el vigor e el porcentaje de células con cromatina intacta fue semejante para todas las razas (Cuadro 2). Los animales de las razas Crioulo Lageano y Junqueira presentaron motilidad inferior a la demostrada por las demás razas. Además de la baja motilidad, el animal de la raza Crioulo Lageano presentó una alta porcentaje de células anormales y la raza Junqueira una baja

concentración espermática, cuando comparado a los demás (Tabla 2). Las anomalías espermáticas observadas con mayor frecuencia en el semen del toro de la raza Crioulo Lageano fueron cabeza y pieza intermediaria (Cuadro 3).

Los patrones mínimos determinados por el Colegio Brasileño de Reproducción Animal (CBRA) para que un eyaculado pueda ser congelado son los siguientes: motilidad en masa 3, vigor 3, motilidad

en masa 70% y lo máximo 30 % de anomalías espermáticas totales (7). Por lo tanto, de todos los animales evaluados, solo las razas P y C, presentaban semen con características adecuadas para la criopreservación de acuerdo con las recomendaciones del CBRA.

Para evaluar el efecto de la criopreservación sobre las características espermáticas de animales de razas naturalizadas fueron utilizados dos animales de la raza

**Cuadro 2.** Evaluación física y morfológica del semen bovino de varias razas naturalizadas brasileñas tras electroeyaculación (promedio de tres extracciones seminales).

| Raza           | Motilidad en Masa (1-5) | Motilidade Individual (0-100%) | Vigor (1-5) | Concentración Espermática (x10 <sup>6</sup> spz/ml) | Células Normales (%) | Células con Cromatina Integra (%) |
|----------------|-------------------------|--------------------------------|-------------|---|----------------------|-----------------------------------|
|                | X ± dt                  | X ± dt                         | X ± dt      | X ± dt  | X ± dt               | X ± dt                            |
| Pantaneira     | 2,6 ± 0,6               | 70,0 ± 5,0                     | 3,0 ± 0,0   | 113,0 ± 36,2  | 78,7 ± 1,1           | 98.5                              |
| Junqueira      | 2,0 ± 1,0               | 46,6 ± 15,3                    | 3,0 ± 0,0   | 69,6 ± 2,5  | 81,4 ± 1,1           | 100.0                             |
| Criolo lageano | 2,3 ± 0,6               | 58,3 ± 2,8                     | 2,3 ± 0,6   | 383,3 ± 146,8                                       | 59,7 ± 1,6           | 97.0                              |
| Mocho nacional | 3,6 ± 2,3               | 68,3 ± 24,6                    | 3,0 ± 3,0   | 290,0 ± 217,0                                       | 92,7 ± 1,2           | 98.5                              |
| Curraleira     | 3,0 ± 1,0               | 70,0 ± 0,0                     | 3,0 ± 0,0   | 335,0 ± 52,9  | 82,2 ± 2,0           | 98.5                              |

X = promedio y dt = desviaciones típicas

**Cuadro 3.** Porcentaje de patologías espermáticas observadas en muestras de semen bovino de las razas naturalizadas brasileñas (promedio de tres extracciones seminales).

| Raza           | Defectos de cabeza (%) | Defectos de pieza intermediaria (%) | Defecto de la cola (%) | Total de defectos (%) |
|----------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|
|                | X ± dt                 | X ± dt                              | X ± dt                 | X ± dt                |
| Pantaneira     | 10,0 ± 0,0             | 6,0 ± 0,0                           | 5,3 ± 1,1              | 21,3 ± 1,1            |
| Junqueira      | 7,0 ± 1,7              | 4,0 ± 0,0                           | 7,6 ± 1,5              | 18,6 ± 1,1            |
| Criolo lageano | 14,6 ± 1,4             | 20,5 ± 0,0                          | 5,2 ± 0,3              | 40,3 ± 1,6            |
| Mocho nacional | 2,0 ± 0,0              | 2,0 ± 0,0                           | 2,8 ± 0,6              | 6,8 ± 1,4             |
| Curraleira     | 4,2 ± 2,0              | 4,5 ± 0,0                           | 7,8 ± 1,3              | 16,5 ± 3,1            |

X = promedio y dt = desviaciones típicas.

Curraleira y un animal de la raza Nelore (control). Los animales fueron seleccionados por presentaren características seminales semejantes y dentro de los patrones indicados por el CBRA (7), antes de sometidos a la criopreservación (Cuadro 4).

Todos los animales evaluados presentaron un descenso en la motilidad poscongelación cuando comparados a la precongelación, siendo que un de los reproductores de la raza Curraleira tuvo un descenso considerable (60%) en la motilidad de poscriocongelación. De la misma forma, ocurrió un descenso en el vigor en todas las muestras analizadas. Una variación en la morfoanomalía espermática

fue también observada, a pesar de ese parámetro tener sido menos afectado por el proceso de criopreservación que la motilidad (Cuadro 4). En el cuadro 5 se puede observar que el porcentaje de cola fuertemente doblada en el poscongelación fue la anomalía que más varió con relación a la precongelación, aumentándose el porcentaje total de las células anormales.

En el cuadro 6 encuéntrase los resultados referentes a la integridad del acrosoma y de la cromatina antes y después de la criopreservación. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó en el poscongelación. Sin embargo, cuando el porcentaje de células vivas con acrosoma intacto es conside-

rado (Cuadro 6), se observa una reducción acentuada del semen de los toros de la raza Curraleira, siendo superior la disminución observada en el toro control. No hubo variación entre la pre y poscongelación, o sea, la criopreservación no afectó la integridad del ADN en los eyaculados evaluados, (Cuadro 6).

Cuando el semen de animales de la raza Curraleira fueron utilizados para la fecundación *in vitro*, las tasas de clivaje y blastocisto, fueron inferiores ( $p < 0.05$ ) a las del toro control (Cuadro 7), siendo que el toro dos de la raza Curraleira presentó menor ( $P < 0,05$ ) tasa de clivaje (52,0%) y la menor tasa de blastocisto (8,6 %).

**Cuadro 4.** Características físicas y morfológicas del semen de reproductores bovinos de las razas Curraleira (C) y Nelore (Control) durante la pre y poscriocongelación.

|                | Motilidad |      | Vigor |      | Defectos Mayores |      | Defectos Menores |      | Total de defectos |      |
|----------------|-----------|------|-------|------|------------------|------|------------------|------|-------------------|------|
|                | pre       | post | pre   | post | pre              | post | pre              | post | pre               | post |
| <b>Toros</b>   | (%)       | (%)  |       |      | (%)              | (%)  | (%)              | (%)  | (%)               | (%)  |
| <b>Control</b> | 80        | 70   | 4     | 3    | 8,5              | 17   | 4,5              | 3    | 13                | 20   |
| <b>C 1</b>     | 80        | 50   | 4     | 3    | 8                | 19   | 4,5              | 1,5  | 12,5              | 20,5 |
| <b>C 2</b>     | 80        | 20   | 4     | 3    | 6                | 18   | 2,5              | 0,5  | 8,5               | 18,5 |

**Cuadro 5.** Evaluación de la morfoanomalía espermática del semen de sementales bovinos de las razas Curraleira (C) y Nelore (Control) en el pre y poscongelación.

| Toro    | Defectos Mayores |          |                          |          |                              |          |                            |          | Defectos Menores |          |             |          | Total de defectos |          |      |      |
|---------|------------------|----------|--------------------------|----------|------------------------------|----------|----------------------------|----------|------------------|----------|-------------|----------|-------------------|----------|------|------|
|         | Acrosoma rugoso  |          | Cola fuertemente Doblada |          | Gota Citoplasmática Proximal |          | Gota Citoplasmática Distal |          | Cabeza Aislada   |          | Knob esper. |          | Pouch form        |          | pre  | post |
|         | pre (%)          | post (%) | pre (%)                  | post (%) | pre (%)                      | post (%) | pre (%)                    | post (%) | pre (%)          | post (%) | pre (%)     | post (%) | pre (%)           | post (%) |      |      |
| Control | 4                | 3,5      | 2                        | 14       | 2                            | 5        | 0,5                        | 0        | 0                | 0        | 1           | 0        | 3,5               | 0        | 13   | 20   |
| C 1     | 2                | 6        | 1,5                      | 11       | 1,5                          | 1        | 1                          | 0        | 0,5              | 0        | 2,5         | 0        | 2                 | 1        | 12,5 | 20,5 |
| C 2     | 4                | 5,5      | 1                        | 7,5      | 1                            | 1,5      | 0                          | 0,5      | 0                | 0        | 1,5         | 0,5      | 1                 | 0        | 8,5  | 18,5 |

**Cuadro 6.** Evaluación de la integridad del acrosoma y cromatina espermática de los sementales de las razas Curraleira (C) y Nelore (Control) durante la pre y poscongelación.

| Toro           | Evaluación de la integridad del acrosoma |        |                            |        | Evaluación de la integridad de la cromatina |        |
|----------------|--|--------|----------------------------|--------|---|--------|
|                | Vivos con acrosoma                       |        |                            |        | Cromatina integra                           |        |
|                | intacto                                  |        | Total con acrosoma intacto |        | % pre                                       | % post |
|                | % pre                                    | % post | % pre                      | % post |   |        |
| <b>Control</b> | 70,0                                     | 63,0   | 95,0                       | 89,0   | 100   | 100    |
| <b>C 1</b>     | 71,5                                     | 33,5   | 94,0                       | 62,0   | 100   | 100    |
| <b>C 2</b>     | 74,5                                     | 17,5   | 95,0                       | 84,5   | 100   | 98     |



**Cuadro 7.** Tasa de clivage y de blastocisto posfecundación in vitro de ovocitos bovinos, utilizándose semen criop congelado, de sementales bovinos de las razas Curraleira (C) y Nelore (N).

| Toro                | Nº de ovocitos | Clivage <sup>1</sup> (%) | Blastocisto en el D7 (%) |
|---------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Control</b>      | 144            | 127 (88,2) <sup>c</sup>  | 62 (43,1) <sup>c</sup>   |
| <b>Curraleiro 1</b> | 147            | 112 (76,2) <sup>a</sup>  | 33 (22,4) <sup>a</sup>   |
| <b>Curraleiro 2</b> | 150            | 78 (52,0) <sup>b</sup>   | 13 (8,6) <sup>b</sup>    |

<sup>1</sup>Evaluación realizada 44 horas posinseminación.

<sup>a,b,c</sup> Representan diferencia significativa entre toros ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ).

## DISCUSIÓN

La fertilidad de un macho está relacionada a varios factores, tales como: producción espermática, viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides del eyaculado, deseo sexual y capacidad de monta. El método más utilizado para evaluar la fertilidad todavía es el examen andrológico completo, que involucra varios testes tales como el análisis físico y morfológico del semen, evaluación del interés sexual y biometría testicular. Si embargo, muchas veces toros con semen de motilidad normal y número adecuado de espermatozoides normales, ni siempre atingen tasas aceptables de concepción, pues los espermatozoides del eyaculado pueden tener problemas estructurales u funcionales y se tornaren incapaces para fecundar. Por eso motivo, otras características espermáticas tales como la integridad de la cromatina, la integridad del acrosoma y la capacidad de se ligar a zona pelúcida del ovocitos deben ser evaluadas.

La toma de la circunferencia escrotal es, indiscutiblemente, una medida fácil de ser obtenida y altamente relacionada con producción espermática, además de ser de alta heredabilidad (2). Todos los animales evaluados presentaron una circunferencia escrotal superior a 30 cm, a pesar de eso, la circunferencia escrotal fue inferior a normalmente encontrada en animales de las razas europeas (1), así como de razas zebuínas (6). Teniendo en vista que, las razas naturalizadas son originadas de las razas europeas era es-

perado que ellos presentasen circunferencia escrotal más próxima de las razas europeas. Sin embargo, es posible que debido a selección natural a que esas razas fueron sometidas, los aspectos relativos a rusticidad y adaptabilidad tengan sido seleccionado en detrimentos de aquellos relacionados a fertilidad. Si embargo, es difícil hacer comparaciones porque en este estudio se utilizó un solo semental/raza, aliada a la escasez de datos relativos a esos animales en la literatura especializada. Vale resaltar que el semental de la raza Junqueira fue lo que presentó mayor circunferencia escrotal, que es indicativo de mayor producción espermática, pero presentó una menor concentración, indicando que ninguna medida aisladamente debe ser utilizada para evaluaciones de la reproducción de los sementales.

Las características físicas del semen como motilidad en masa y vigor fueron semejantes para todos los animales. El mismo ocurrió con el porcentaje de células con cromatina intacta, siendo esa característica una de las responsables por pérdidas embrionarias, visto que la cromatina alterada permite que el espermatozoide fecunde el ovocito, pero ese no llega además de estadio de pro-núcleo, no ocurriendo consecuentemente desarrollo embrionario (4,24).

Los sementales de la raza Curraleira y Pantaneira fueron los que presentaron características seminales de acuerdo con los patrones de fertilidad considerados aceptables por el CBRA. Los demás pre-

sentaron baja motilidad y alta porcentaje de células anómalas. La motilidad es esencial para la fertilidad, a pesar de no ser necesariamente indicativa de capacidad fecundante. De todos los modos, la morfoanomalía espermática es también una importante característica, pues la misma está relacionada a función del espermatozoide. Alteraciones morfológicas, principalmente ubicadas en la región de la cabeza, afectan la capacidad del espermatozoide de fecundar, comprometiéndose consecuentemente la tasa de concepción (22,23).

Cuando el semen de animales de la raza Curraleira fue sometido a criop congelación, todas las muestras presentaron un descenso en el vigor y en la motilidad en lo poscongelación cuando comparado a la precongelación. Siendo que un de los reproductores tuvo una disminución considerable (60%) en la motilidad, indicando la sensibilidad individual diferenciada con relación a las injurias de la criop congelación. Esos resultados ya eran esperados visto que la criop congelación causa daños en el espermatozoide y un de los primeros señales es la reducción del porcentaje de espermatozoides vivos. Ese descenso en la motilidad y vigor están relacionados al estrés y injurias causadas en los espermatozoides durante el proceso de criop congelación (17,18).

Se ha observado una variación en la morfoanomalía espermática, aún que tenga sido menos influenciada por el proceso de criop congelación do que el observado para la motilidad. El porcentaje de cola

fuertemente doblada en el poscongelación fue la anomalía que más varió con relación a la pre congelación, elevando el porcentaje total de las células anómalas. Es importante resaltar que ese tipo de anomalía también puede ser provocada por la manipulación del semen en el momento de la descongelación. Los procesos de congelación y descongelación también tracen daños irreversibles a varias membranas de los espermatozoides, pudiendo también causar daños estructurales a célula (17,18). Por lo tanto, en eso estudio también fue evaluado la integridad del acrosoma antes y después de la criocongelación. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto presentó leve disminución en el poscongelación. Sin embargo, el aspecto más importante con relación a esa característica es el porcentaje de células vivas con acrosoma intacto, visto que esas son las células dentro de la población que tiene la posibilidad de fecundar el ovocito. Cuando esa evaluación fue considerada se ha observado una brusca reducción del semen de los reproductores de la raza Curraleira, habiendo una variación considerable entre ellos. Esa característica tiene sido correlacionada (25) con daños que la criocongelación causa a las células espermáticas. Por otro lado, se ha demostrado que la integridad del acrosoma presenta alta correlación con la tasa de penetración (3), confirmando la importancia de ese parámetro en la funcionalidad del gameto masculino.

La criocongelación no afectó la integridad del ADN en los sementales evaluados, no habiendo variación entre pre y poscongelación.

La fertilidad de los toros está relacionada con la capacidad del espermatozoide de fecundar el ovocito, formar el cigoto

y proporcionar un desarrollo embrionario normal. Con el advenio de la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) se ha tornado posible evaluar la capacidad fecundante y el papel del espermatozoide después de la fecundación (9,10). Los sementales de la raza Curraleira presentaron tasas divisiones celulares (clivage) y blastocisto inferiores al del toro control. Sin embargo, el toro 2 de la raza Curraleira presentó menor tasa de clivage y blastocisto que el toro 1. Vale resaltar que el toro 2 también presentó la menor motilidad y el menor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en la evaluación posdescongelación, indicando que el semen es de fertilidad inferior u es más susceptible a las injurias de la criocongelación que el toro 2 de la misma raza. Esos resultados indican que la determinación de las características físicas (motilidad individual y en masa, vigor y concentración), por si solo no son suficientes para predecir la fertilidad de un semental. Las evaluaciones poscriocongelación son muy necesarias para si tener una mejor estimativa acerca de la fertilidad del semen criocongelado.

Debido al pequeño muestreo no se puede sacar conclusiones definitivas en esto estudio, pero ya señala los primeros datos sobre algunas características andrológicas de sementales de razas naturalizadas brasileñas, tornándose imprescindible la evaluación de un mayor número de animales para se tener mejor conocimiento acerca del patrón andrológico de esas razas. Los resultados obtenidos aquí muestran que es posible utilizar semen de esos animales para la criocongelación y posterior utilización en la producción "in vitro" de embriones. Si embargo, el aspecto más importante de esto trabajo es que, en lo que se refiere a los animales

en extinción, se deba tener un mayor cuidado en el momento de la evaluación del semen criocongelado, pues como en general se dispone de pocos ejemplares dentro de una misma raza, sementales rechazados deben ser sometidos a exámenes complementares, pues dependiendo del tipo de problema presentado, se puede utilizar alternativas, como, por ejemplo, aumentar la concentración espermática, en la tentativa de criopreservar este material. Todavía, se puede utilizar otras técnicas que posibiliten el uso de eso material, mismo con algunos problemas, como es el ejemplo de la fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

## CONCLUSIONES

La evaluación andrológica de sementales de razas naturalizadas brasileñas permite identificar animales con características seminales adecuadas para la criocongelación. El semen de sementales en programas de conservación "In Situ" debe ser criopreservado, sin embargo, la extensión de las injurias causadas por el estrés de la congelación depende de características individuales, siendo que las más afectadas la integridad del acrosoma y la motilidad. La evaluación de las características estructurales y funcionales de los espermatozoides posdescongelación debe ser realizada en todas las partidas de semen que serán utilizadas en la formación de bancos de germoplasma. El semen de estos animales también puede ser utilizado para la producción *in vitro* de embriones.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José Robson Bezerra Sereno, Embrapa Pantanal, por las valiosas sugerencias técnicas y traducción del manuscrito.

## Referencias Bibliográficas

1. Brito, L.F.; Silva, A.E.; Rodrigues, L.H.; Vieira, F.V.; Deragon, L.A.; Kastelic, J.P. (2002). Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology* 58:1175-86.
2. Cyrillo, J.N.S.G.; Razook, A.G.; Figueiredo, L.A. *et al.* (2001). Estimativa de tendências e parâmetros genéticos do peso padronizado aos 378 dias de idade, medidas corporais e perímetro escrotal de machos Nelore de Sertãozinho, SP. *Rev. Bras. Zootec.* 30:56-65.
3. Dode, M.A.N.; Chiochetta, L.; Rodovalho, N.C.; Zúccari, C.E.S.N. (2000). Teste de penetração de ovócitos: associação com características seminais (resultados preliminares). *Arq. Facul. Vet.* 28: 242.
4. Ellington, J. E.; Evenson, D. P.; Fleming, J. E.; Brisbois, R. S.; Hiss, G. A.; Broder, S. J.; Wright, R.W. (1998). Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil. Steril.* 69:643-649.
5. Feliciano Silva, A.E.D. (1998). Reação acrossômica induzida: Método indicador de fertilidade de touros. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, Dezembro. 38p. (Documento 35).
6. Feliciano Silva, A.E.D.; Unanian, M.M.; Cordeiro, C.M.T.; Freitas, A.R. (2002). Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. *Rev. Bras. Zootec.* 31:1168-1176.
7. Fonseca, V.O.; Vale Filho, V.R. do; Filho, A.M.; Abreu, J.J. (1992). Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. *Colegio Brasileiro de Reprodução Animal*, CBRA, Belo Horizonte, 79p.
8. Holmes P.; Booth P.J.; Schmidt M.H.; Greve T.; Callesen H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52:683-700.
9. Larsson B, Rodriguez-Martinez H. (2000). Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:327-36.
10. Lonergan, P. (1994). The application of *in vitro* fertilization techniques to prediction of Bull fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 29:12-21.
11. Mariante A.S.; Cavalcante N. (2000). Animals of the Discovery: Domestic breeds in the History of Brazil. *Brasilia, Embrapa*, pp.228.
12. Mariante, A.S.; Egito, A.A. (2002). Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology* 57:223-235.
13. Martins, C. F. (2002). Congelamento de sêmen bovino. *In: Dode, M.A.N.; Martins, C. F.; Silva, A.E.D.F.; Zúccari, C.E.S.N.; Pimentel, C.A.; Melo, N.S.S.* Apostila do Curso de Andrologia, Brasília: Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia, pp. 220.
14. Parrish, J.J.; Susko-Parrish, J.L.; Winer, M.A.; First N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38:1171-1180.
15. Parrish J.J.; Krogenaes A.; Susko-Parrish J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44:859-869.
16. Pereira, D.C.; Dode, M.A.N.; Rumpf, R. (2004). Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, *In press*.
17. Rodriguez-Martinez, H.; Larsson, B.; Pertoft, H. (1997a). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:297-308.
18. Rodriguez - Martinez, H.; Zhang, B.R.; Larsson, B. (1997b). Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. *Arq. Facul. Vet.* 25:108-126.
19. Rumpf, R.; Dode, M.A.N.; Silva, A.E.D.F. (2000a) Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. *In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL*, 3, Belo Horizonte: [Anais...]. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2000. p.248-253.
20. Rumpf, R.; Dode, M.A.N.; Brandão, D.; Peixer, M.A. (2000). Multiplication biotechniques in the conservation of female germplasm. The Embrapa Genetic resource and Biotechnology experience. *In: GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCES*, 5., Brasília. Proceedings. Brasília: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, 2000. CD-ROM.
21. Tejada, R. I.; Mitchell, J. C.; Norman, A.; Marik, J. J.; Friedman, S. A. (1984). Test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescent. *Fertil. Steril.* 42:87-91.
22. Thundathil J.; Palasz A.T.; Mapletoft. R.J.; Barth, A.D. (1999). An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 57(1-2):35-50.
23. Thundathil J.; Meyer R.; Palasz A.T.; Barth, A.D.; Mapletoft. R.J. (2000). Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology* 54:921-34.
24. Unanian, M. M. (2000). Integridade da cromatina. Método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. *In: Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia*. Brasília, 2000, (Documento 56).
25. Way, L.A.; Henault, A.M.; Killian, G.J. (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 43:1301-1316.