

AVALIAÇÃO CLÍNICO-ANDROLÓGICA EM TOUROS NELORE E TESTES DE VIABILIDADE ESPERMÁTICA, INTEGRIDADE DE ACROSSOMA E FRAGMENTAÇÃO DE CROMATINA AO LONGO DE TRÊS ESTAÇÕES REPRODUTIVAS

ROGÉRIO ORFALY ADDAD,¹ GUSTAVO EDUARDO FRENEAU,¹ LORENN CARDOSO RESENDE¹ E LEONARDO MARÇAL DA SILVA²

1. Laboratório de Andrologia e Tecnologia do Sêmen, Escola de Veterinária, UFG, Caixa Postal 131, Campus II, CEP 74001-970, Goiânia-GO.
Tel/Fax: (62) 3521 1585, e-mail: gfreneau@gmail.com

2. Médico Veterinário da CLASSEVET.

RESUMO

Com os objetivos de verificar a evolução da qualidade dos ejaculados de touros da raça Nelore ao longo três anos, através do exame clínico-andrológico associado de testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e a fragmentação da cromatina, e estabelecer relações entre estas características e com a prenhez com grupos de diferentes tipos de fêmeas, utilizaram-se 46 touros da raça Nelore com idade entre 30 e 120 meses, para avaliação da qualidade seminal e da aptidão reprodutiva. Os animais foram mantidos em condições extensivas, com alimentação a pasto, recebendo suplementação mineral e servindo um rebanho com 3.782 fêmeas de várias categorias (novilhas, vacas primíparas e pluríparas). Realizaram-se colheitas de dados que abrangiam medidas de circunferência escrotal e avaliação do sêmen colhido por eletroejaculação e avaliaram-se as características físicas (volume, turbilhonamento, motilidade, vigor), morfológicas (defeitos maiores, menores e totais) e de integridade espermática (integridade de membrana plasmática, de acrossoma e de cromatina) no período que antecedeu três estações de monta consecutivas (2003, 2004 e 2005). Submeteram-se os dados à análise de variância,

compararam-se as médias pelo teste SNK e calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson utilizando o SAS. Os touros apresentaram circunferência escrotal de $33,8 \pm 2,8$ cm, $15,6 \pm 8,5\%$ de defeitos espermáticos totais, $40,1 \pm 23,1\%$ de gametas com membrana e acrossoma íntegros e $8,8 \pm 3,8\%$ de cromatina fragmentada. As relações entre circunferência escrotal, as características físicas, morfológicas e de integridade espermática e o desempenho reprodutivo do rebanho foram baixas e não significativas ($P > 0,05$). As características reprodutivas dos touros permaneceram dentro de padrões aceitáveis ao longo de três anos de avaliação. Nos touros deste experimento, os defeitos espermáticos, a integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina nuclear não foram frequentes a ponto de comprometer a qualidade seminal e o desempenho reprodutivo dos animais. Não houve relação entre os defeitos espermáticos com a integridade acrossômica e/ou a fragmentação da cromatina nuclear. Não houve relação entre a prenhez com as características apresentadas pelos touros estudados

PALAVRAS-CHAVES: Acrossoma, cromatina, espermatozoides, Nelore, reprodução, sêmen, touros.

ABSTRACT

BREEDING SOUNDNESS EXAMINATION IN NELORE ZEBU BULLS AND SPERM VIABILITY, ACROSSOME AND CHROMATIN INTEGRITY ASSAY FOR THREE BREEDING SEASONS

This work aimed to verify the evolution of seminal quality in zebu Nelore bulls in three years by the breeding soundness examination and integrity of plasmatic membrane,

acrosome and chromatin and establish relationships among those characteristics and the pregnancy with different females groups. Forty six bulls with age between 30 and

120 months were used to evaluation of the seminal quality and the reproductive aptitude. The animals had been kept in extensive conditions, with feeding the grass, receiving mineral supplementation and serving a herd with 3,782 females of some categories (heifers and cows). Data enclosed measured of scrotal circumference and evaluation of the semen collected by eletroejaculation and evaluated the physical characteristics (volume, mass activity, motility, strong), morphologic (major, minor and total defects) and spermatic structure integrity (integrity of plasmatic membrane, acrosome and chromatin) in this period had been carried through that preceded three consecutive mating season (2003, 2004 and 2005). The data had been submitted analyze of variance, the averages compared for test SNK and the coefficient of correlation of Pearson was calculated using

the SAS. The bulls presented scrotal circumference of 33.8 ± 2.8 cm, $15.6 \pm 8.5\%$ of total spermatic defects, $40.1 \pm 23.1\%$ of gametes with normal membrane and acrosome and $8.8 \pm 3.8\%$ of fragmented chromatin. The relations between scrotal circumference, physical and morphologic characteristics, spermatic integrity and the reproductive performance of the herd had been low and not significant ($P < 0.05$). The bulls reproductive characteristics showed acceptable standards in three years. The sperm defects, plasmatic membrane and acrosome integrity, fragmented chromatin had not high frequency to compromise the seminal quality. There are not relationships among sperm defects with acrosome integrity and fragmented chromatin. No relationships was observed between pregnancy and bull reproductive characteristics.

KEY WORD: Acrosome, bulls, cattle, chromatin, nelore, reproduction, sperm defects.

INTRODUÇÃO

O principal objetivo do touro em um sistema de acasalamento por monta natural é de emprenhar todas as fêmeas disponíveis, num período de tempo o mais curto possível na estação. Portanto, é indispensável que o reprodutor seja capaz de identificar, realizar a cobertura e depositar no trato reprodutivo da fêmea um número suficiente de espermatozoides (FRENEAU et al., 2000). Neste contexto, o exame clínico-andrológico tem sido amplamente empregado, como método indicador da aptidão reprodutiva dos touros designados a servir em estação de monta ou doação de sêmen. Entretanto, essa avaliação tem-se mostrado aquém do necessário, para determinar de maneira segura essa condição (SILVA, 1998). Sendo assim, não basta ao touro apresentar padrões seminais aceitáveis para morfologia espermática, motilidade progressiva, vigor e percentual de espermatozoides normais. A principal característica a ser avaliada para estimar o potencial fecundante do sêmen é a qualidade dos embriões produzidos e se seu desenvolvimento posterior ocorre de forma normal (WALTERS et al., 2005a).

Portanto, o diagnóstico do potencial fecundante de um ejaculado é essencial para a eficiência reprodutiva, já que o uso de reprodutores subfêrteis pode trazer consequências desastrosas para o rebanho. Para tanto, são fundamentais o desenvol-

vimento e a aplicação de técnicas de diagnóstico que permitam avaliar a qualidade do sêmen e que ofereçam resultados consistentes (SILVA et al., 1998). Os testes laboratoriais que avaliam as características estruturais dos elementos espermáticos envolvidos diretamente na fertilização (membrana plasmática, acrossoma e cromatina nuclear) proporcionam importante contribuição para a análise, interpretação e determinação de padrões, sem que ocorra o comprometimento da qualidade seminal e do sucesso (SILVA, 1998; EVENSON et al., 1999).

Os objetivos deste trabalho foram verificar a evolução da qualidade dos ejaculados de touros da raça Nelore ao longo três anos através do exame clínico andrológico associado de testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e a fragmentação da cromatina e estabelecer relações entre essas características e com a prenhez com grupos de diferentes tipos de fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 46 touros da raça Nelore com idade média de $67,8 \pm 18,6$ meses para avaliação clínico-andrológica antes do início do período de acasalamento, durante três estações de monta consecutivas (anos de 2003, 2004 e 2005), produzindo 108 amostras de sêmen, e para os testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina.

Os touros foram destinados a uma estação de monta de 120 dias, servindo 1.248 fêmeas (202 novilhas, 372 vacas primíparas, 627 vacas múltiparas e 69 vacas solteiras) agrupadas em dez lotes de acasalamento com 35 touros, no ano de 2003; 1.270 fêmeas (190 novilhas, 358 vacas primíparas, 617 vacas múltiparas e 83 vacas solteiras) agrupadas em três lotes de acasalamento com 38 touros, no ano de 2004; e 1.264 fêmeas (209 novilhas, 307 vacas primíparas, 652 vacas múltiparas e 96 vacas solteiras) agrupadas em três lotes de acasalamento com 35 touros em 2005.

Ao final das estações de 2003 e 2004 obteve-se o percentual de prenhez por meio de palpação retal. Na estação de 2005, houve a necessidade de se misturar os lotes de acasalamento dos touros, em virtude de acidentes nas pastagens da propriedade, perdendo-se, assim, a caracterização dos diferentes lotes. Os animais foram mantidos em pastagem de *Andropogon gayanus* e *Brachiaria brizantha* (divididas e manejadas sob orientação técnica) durante todo o período experimental, recebendo sal mineral *ad libitum*.

Para a avaliação andrológica dos touros, mensurou-se a circunferência escrotal e em seguida colheu-se o sêmen pelo método de eletroejaculação. Foram avaliadas as características físicas do ejaculado (movimento em massa ou turbilhão, motilidade progressiva e vigor) segundo técnicas de rotina (CBRA, 1998).

Posteriormente, procedeu-se ao envio de amostras fixadas em solução formol-salino ao laboratório para avaliação morfológica espermática, preparando-se lâminas úmidas observadas em microscopia de contraste diferencial de interferência de fase sob imersão (aumento de 1.000x). Foram contados duzentos espermatozoides por lâmina, os quais foram classificados conforme o percentual de gametas normais, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais (BLOM, 1973).

A viabilidade espermática e a integridade de acrossoma foram determinadas pelo método de coloração dupla por Tripán Blue e Giemsa (TBG), adicionando-se uma gota de sêmen de 20µL a outra gota de 20µL de solução corante de Trypan Blue 0,4% em criotubo por vinte minutos a 37°C. Após encubação, centrifugou-se a amostra a 700

gravidades durante seis minutos, sendo esse processo de centrifugação repetido até que a solução apresentasse cor azul-pálido (SILVA et al., 1998). Posteriormente, efetuaram-se dois esfregaços e após a secagem as lâminas foram fixadas em metanol por cinco minutos e imergidas em Giemsa por 24 horas. Após a lavagem e secagem das lâminas, avaliou-se o esfregaço em microscopia de campo claro por imersão. Contaram-se duzentas células e estimou-se o percentual de espermatozoides vivos ou mortos com acrossoma íntegro ou acrossoma lesado (alguma alteração morfológica ou de coloração) no sêmen.

Para a avaliação da integridade da cromatina espermática – forma natural (fita dupla) ou desnaturada (fita simples ou fragmentada) –, foi aplicada a técnica de coloração com laranja de acridina (LA) modificada, proposta por TEJADA et al. (1984), nos anos de 2003 (35 touros avaliados), 2004 (38 touros avaliados) e 2005 (35 touros avaliados), totalizando 108 análises a partir de amostras de sêmen fixado em formol salino. Utilizaram-se 20 µL de sêmen adicionado em um criotubo com solução salina e procedeu-se à centrifugação por dois minutos a 37°C em 200g, repetindo-se o processo duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi retirado e preparou-se o esfregaço em uma lâmina. Após a secagem, fixou-se o esfregaço em solução de metanol-ácido acético (3:1) por 24 horas. Após esse período, foi empregada a coloração de LA por cinco minutos, seguida pela lavagem com água destilada. Após a secagem, a lâmina foi observada em microscopia de fluorescência.

Foi adotado o delineamento estatístico a partir dos cálculos dos valores médios e desvio-padrão da idade, condição corporal, CE, das características físicas, morfologia espermática, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e de cromatina. Submeteram-se os dados resultantes à análise de variância e compararam-se as médias pelo teste SNK (entre grupos de acasalamento e estações de monta). O índice de correlação de Pearson entre as variáveis dependentes – CE, características físicas e morfológicas do ejaculado, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e de cromatina e taxa de prenhez – foi

calculado pelo SAS (1997), segundo o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T + F_i + E_j + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$$Y_{ijk} = \text{variáveis dependentes;}$$

μ = média de todas as observações;

T = efeito do touro; F = efeito da categoria de fêmea servida pelos touros de índice i, sendo i = 1 (novilhas), 2 (primíparas) e 3 (vacas); E_j = efeito do período de coleta do sêmen de índice j, sendo j = 1 (estação de monta 2003), 2 (estação de monta 2004) e 3 (estação de monta 2005); e_{ijk} = erro aleatório residual.

A comparação da prenhez dentro do ano e categoria de fêmeas foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SAS, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentadas as características reprodutivas estudadas no sêmen dos touros junto com dados de todos os grupos de acasalamento. A média geral nos três anos de observação dos defeitos maiores (10,1%), menores (5,6%) e totais (15,6%) são semelhantes aos encontrados por MARTINEZ et al. (2000) para touros da raça Gir (7,86%, 5,09% e 12,95%, respectivamente), por FITZPATRICK et al. (2002) para touros da raça Brahman (defeitos totais: 11,9%) e por SILVA et al., (2002) para touros da raça Nelore (9,5%, 3,1% e 12,6%, respectivamente). Porém, foram maiores que os relatados por GALVANI (1998) em touros da raça Nelore (4,04%, 3,12% e 7,16%, respectivamente), que atribuiu como causa para esses resultados as condições de manejo e nutrição dos rebanhos. Apesar disso, não pode ser descartado que essas diferenças sejam devidas às técnicas utilizadas na avaliação da morfologia espermática (FRENEAU et al., 2009).

A relação fêmea-touro ao longo dos três anos foi de $37,3 \pm 7,1$, não apresentando, possivelmente, efeito sobre a taxa de prenhez dos diferentes grupos de acasalamento. Não houve correlação entre o número de fêmeas por touro com a prenhez geral. Essa tendência contradiz estudos

prévios que relataram maior prenhez em grupos de cinquenta fêmeas por touros confrontados com os de vinte e cinco (FRENEAU et al., 2008).

Os touros tiveram sua aptidão reprodutiva avaliada nas sucessivas estações de monta (Tabela 2). Na primeira avaliação (ano 2003), apenas um touro foi considerado inapto. Já em 2004, recomendou-se o afastamento de cinco animais e na estação de 2005 todos os reprodutores foram considerados aptos para a reprodução. O exame clínico-andrológico diagnosticou a condição reprodutiva individual dos touros, indicando o descarte de 16,6% dos animais utilizados neste experimento.

As patologias espermáticas encontradas mais frequentemente foram defeitos de acrossoma (achatado no ápice), cabeças pequenas, decapitadas, diademas e crateras, cabeças subdesenvolvidas, estreitas, curtas, largas e decapitadas, defeitos de peça intermediária (peça filiforme, grossa, delgada), caudas enroladas na cabeça e na peça intermediária, gotas citoplasmáticas proximais e distais.

Esses defeitos estão comumente associados a distúrbios do mecanismo de termorregulação testicular, sendo também observados em touros que foram tratados com dexametasona, indicando que o estresse provocado pelo calor ou por práticas de manejo é a forma mais comum de injúrias interferindo na espermatogênese (BARTH & OKO, 1989; KASTELIC et al., 1997). Neste experimento, as causas dos defeitos espermáticos não tiveram sua origem determinada.

As correlações entre volume, turbilhonamento, motilidade, vigor, defeitos maiores, menores, com a CE, foram baixas e próximas de zero, e semelhantes às obtidas por MARTINEZ et al. (2000) e por SILVA et al. (2002), para touros da raça Gir e Nelore, respectivamente. Este fato possivelmente se deve à presença, na população de touros, de animais na idade adulta, em que essas relações entre o crescimento somático e testicular se perdem após o período de puberdade e maturidades sexual, como comprovado em touros da mesma raça (FRENEAU et al., 2006).

TABELA 1. Características andrológicas, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e cromatina, proporção touro: fêmea, por grupos de acasalamento em uma propriedade de Cristalina, GO

Grupos	1 (n 4)	2 (n 3)	3 (n 3)	4 (n 2)	5 (n 3)	6 (n 3)	7 (n 3)	8 (n 2)	9 (n 3)	10 (n 3)	11 (n 13)	12 (n 13)	13 (n 2)	14 (n 35)	GERAL
PE	35,8 ± 3,3 ^a	33,3 ± 2,5 ^a	34,0 ± 0,0 ^a	36,3 ± 3,1 ^a	37,3 ± 2,1 ^a	35,0 ± 2,0 ^a	32,5 ± 2,1 ^a	32,7 ± 0,6 ^a	32,7 ± 0,6 ^a	33,3 ± 0,6 ^a	35,0 ± 2,7 ^a	33,7 ± 3,3 ^a	33,5 ± 4,9 ^a	33,1 ± 3,2 ^a	33,8 ± 2,8
VOL	3,8 ± 1,0 ^a	4,0 ± 1,0 ^a	3,0 ± 0,0 ^a	3,3 ± 0,6 ^a	6,3 ± 2,9 ^a	5,7 ± 1,2 ^a	4,5 ± 0,7 ^a	7,7 ± 6,4 ^a	3,3 ± 0,6 ^a	6,0 ± 2,6 ^a	5,0 ± 1,0 ^a	6,0 ± 2,1 ^a	5,0 ± 0,0 ^a	7,9 ± 2,2 ^a	5,9 ± 2,5
TURB	3,5 ± 0,6 ^a	4,0 ± 1,8 ^a	1,5 ± 1,0 ^a	3,0 ± 1,0 ^a	1,7 ± 2,1 ^a	4,0 ± 1,7 ^a	4,5 ± 0,7 ^a	3,7 ± 1,5 ^a	3,7 ± 0,6 ^a	3,0 ± 1,7 ^a	3,7 ± 1,0 ^a	2,6 ± 1,3 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	1,6 ± 1,6 ^a	2,7 ± 1,7
MOT	66,3 ± 7,5 ^a	76,7 ± 14,4 ^a	82,5 ± 3,5 ^a	70,0 ± 13,0 ^a	61,7 ± 10,4 ^a	78,3 ± 7,6 ^a	85,0 ± 7,1 ^a	70,0 ± 17,3 ^a	76,7 ± 11,5 ^a	65,0 ± 22,9 ^a	79,2 ± 8,4 ^a	72,9 ± 12,2 ^a	60,0 ± 7,1 ^a	71,4 ± 16,1 ^a	73,6 ± 13,7
VIGOR	3,8 ± 0,5 ^a	4,3 ± 1,1 ^a	3,0 ± 1,4 ^a	4,0 ± 1,0 ^a	3,3 ± 0,6 ^a	5,0 ± 0,0 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	4,0 ± 1,0 ^a	3,7 ± 0,6 ^a	4,0 ± 1,0 ^a	3,6 ± 1,3 ^a	2,9 ± 1,2 ^a	2,5 ± 0,7 ^a	2,6 ± 1,0 ^a	3,3 ± 1,2
DT	13,1 ± 6,7 ^a	8,5 ± 4,4 ^a	22,0 ± 2,1 ^a	21,7 ± 3,3 ^a	12,8 ± 6,0 ^a	18,7 ± 14,0 ^a	12,2 ± 2,5 ^a	17,0 ± 11,7 ^a	12,7 ± 4,5 ^a	12,5 ± 1,8 ^a	17,0 ± 7,4 ^a	20,6 ± 9,5 ^a	17,5 ± 10,6 ^a	12,1 ± 6,9 ^a	15,6 ± 8,5
DMA	10,0 ± 6,4 ^a	5,2 ± 3,0 ^a	17,8 ± 3,1 ^a	9,3 ± 2,6 ^a	7,3 ± 5,6 ^a	8,5 ± 3,0 ^a	7,0 ± 0,0 ^a	8,7 ± 4,8 ^a	7,2 ± 2,8 ^a	8,2 ± 1,9 ^a	10,0 ± 4,4 ^a	14,3 ± 8,4 ^a	14,0 ± 9,9 ^a	7,9 ± 5,5 ^a	10,1 ± 6,7
DME	3,1 ± 2,2 ^a	3,3 ± 1,4 ^a	4,2 ± 1,1 ^a	12,4 ± 5,1 ^a	5,5 ± 3,0 ^a	10,2 ± 12,0 ^a	5,2 ± 2,5 ^a	8,3 ± 7,5 ^a	5,5 ± 1,7 ^a	4,3 ± 2,1 ^a	7,0 ± 5,3 ^a	6,3 ± 5,6 ^a	3,5 ± 0,7 ^a	4,2 ± 2,8 ^a	5,6 ± 4,5
CROFRA	6,9 ± 5,9 ^a	8,2 ± 3,1 ^a	10,2 ± 5,3 ^a	11,0 ± 0,9 ^a	5,2 ± 4,6 ^a	10,0 ± 2,5 ^a	10,7 ± 1,8 ^a	7,2 ± 6,2 ^a	12,0 ± 1,5 ^a	8,3 ± 2,1 ^a	8,0 ± 4,2 ^a	10,0 ± 2,6 ^a	8,0 ± 2,1 ^a	8,6 ± 3,9 ^a	8,8 ± 3,8
ACRO	6,6 ± 6,0 ^a	3,0 ± 2,3 ^a	15,0 ± 2,1 ^a	2,5 ± 1,3 ^a	5,2 ± 5,7 ^a	5,3 ± 3,5 ^a	4,0 ± 1,4 ^a	4,5 ± 2,8 ^a	3,5 ± 1,3 ^a	4,3 ± 1,6 ^a	5,8 ± 5,1 ^a	8,3 ± 8,3 ^a	11,0 ± 11,3 ^a	3,4 ± 3,2 ^a	5,7 ± 5,9
AUS	27,0 ± 16,4 ^a	28,5 ± 17,5 ^a	26,5 ± 8,5 ^a	35,0 ± 11,8 ^a	33,1 ± 6,0 ^a	38,8 ± 10,1 ^a	56,0 ± 26,1 ^a	28,2 ± 5,3 ^a	32,3 ± 13,3 ^a	48,0 ± 21,5 ^a	*	*	*	31,3 ± 14,4 ^a	34,1 ± 14,6
PI	2,4 ± 1,5 ^a	1,3 ± 0,4 ^a	0,8 ± 0,4 ^a	3,5 ± 2,3 ^a	1,0 ± 0,7 ^a	2,5 ± 1,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	2,2 ± 1,6 ^a	1,3 ± 1,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,8 ^a	3,7 ± 3,2 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	2,2 ± 2,0 ^a	2,3 ± 2,4
CAU	2,5 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,6 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	3,0 ± 2,8 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	1,5 ± 1,4 ^a	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,3 ± 1,3 ^a	1,5 ± 1,3
GCP	2,5 ± 2,8 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	2,5 ± 2,8 ^a	5,3 ± 4,6 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	1,2 ± 0,8 ^a	1,0 ± 0,5 ^a	1,6 ± 1,0 ^a	1,3 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	2,2 ± 2,5 ^a	2,0 ± 2,0
EVAI	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	51,9 ± 24,0 ^a	30,7 ± 16,8 ^a	49,8 ± 46,3 ^a	*	40,1 ± 23,1
EVAR	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	16,1 ± 13,1 ^a	24,9 ± 13,7 ^a	13,8 ± 10,2 ^a	*	20,6 ± 14,6
EMAI	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	7,5 ± 5,9 ^a	8,9 ± 5,8 ^a	5,8 ± 6,7 ^a	*	7,4 ± 5,7
EMAR	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	24,6 ± 24,1 ^a	35,5 ± 18,7 ^a	30,8 ± 42,8 ^a	*	31,8 ± 23,0
Re T/Fe	1/45	1/43	1/43	1/43	1/41	1/40	1/35	1/39	1/45	1/39	1/31	1/39	1/11	*	1/37,3
CatFem	none	vane	vane	vane	vane	vane	vane	prine	prine	vane	vane	prine	none	*	*
Prenhez	89,00	85,00	88,50	73,40	74,00	82,00	78,00	63,00	48,00	79,00	77,00	49,00	91,00	*	67,83

PE: perímetro escrotal, VOL: volume, TURB: turbilhão, MOT: motilidade progressiva, VIGOR, DT: defeitos totais, DMA: defeitos maiores, DME: defeitos menores, CROFRA: cromatina fragmentada, ACRO: defeitos de acrossoma, AUS: acrossoma ausente, PI: defeitos de peça intermediária, CAU: defeitos de cauda, GCP: gota citoplasmática proximal, EVAI: espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, EVAR: espermatozoides vivos com acrossoma reagido, EMAI: espermatozoides mortos com acrossoma íntegro, EMAR: espermatozoides mortos com acrossoma reagido, Re. T/F: relação touro-fêmea, Cat-Fem: categoria de fêmeas (none: novilhas Nelore, prine: Primiparas Nelore, vane: vacas Nelore). (*): dados não disponíveis, letras diferentes entre colunas P<0,05 (SNK).

Além da estimativa dos elementos tradicionais do exame andrológico, foram realizadas provas para avaliar a viabilidade espermática, a integridade do acrossoma, a integridade da cromatina, e seus efeitos no desempenho reprodutivo dos touros. Em duas avaliações andrológicas pré-estação de monta (2003 e 2005), possivelmente devido ao aumento da acidez do corante Giemsa, a técnica de coloração dupla não apresentou resultados satisfatórios. Entretanto, no exame pré-estação de monta 2004, foi possível a aplicação da coloração dupla para viabilidade espermática e integridade de acrossoma. A qualidade dos esfregaços permitiu visualizar também vários defeitos espermáticos (Figura 1). Neste estudo, o valor médio obtido para número de espermatozoides vivos com o acrossoma intacto foi de $40,1 \pm 23,1\%$, sendo inferior aos resultados reportados anteriormente por SILVA et al. (2002) e por TARTAGLIONE & RITTA (2004), de $54,9 \pm 9,9\%$ e $51,2 \pm 4,5\%$, respectivamente. Esses percentuais foram considerados baixos para sêmen fresco, possivelmente devido à influência de fatores externos, como a restrição e carência nutricional da época em que se coletou o sêmen (pré-estação de monta 2004) ou pelo repouso sexual prolongado entre os períodos de monta. Não houve correlação entre as características integridade acrossômica com os defeitos de acrossoma na morfologia espermática.

Não foram observadas correlações significativas entre a CE com o percentual de gametas normais, com a integridade de cromatina ou com o desempenho reprodutivo dos touros na estação de monta. Essas baixas relações possivelmente refletem o bom estado dos touros adultos (SALISBURY et al., 1978; HALLAP et al., 2006). Provavelmente testículos de menor tamanho e ejaculados com anormalidades elevadas atinjam o quadro da morfologia espermática e a fertilidade dos touros.

No que se refere à estrutura da cromatina espermática, o percentual de cromatina fragmentada ($8,8 \pm 3,8\%$) deste estudo (Tabela 1) foi maior do que o valor encontrado por SILVA et al. (2002), para mestiços Nelore ($1,6 \pm 1,7\%$), porém semelhante ao de JANUSKAUSKAS et al. (2001), que trabalharam com animais taurinos ($8,0 \pm 1,6\%$).

Essa variabilidade já foi reportada por BOCHENEK et al. (2001), que observaram em amostras de sêmen de raças taurinas avaliadas e aprovadas nos testes de controle de qualidade das centrais (morfologia, motilidade e resistência ao congelamento) uma grande amplitude no percentual de gametas com cromatina fragmentada de 1,2% a 23,8%. Além disso, estudos realizados por WALTERS et al. (2005b) consideraram razoável a possibilidade de espermatozoides com cromatina fragmentada penetrarem o oócito, dando prosseguimento no desenvolvimento embrionário, porém a viabilidade desses embriões estaria comprometida.

Neste estudo a porcentagem de espermatozoides com estrutura da cromatina desnaturada não apresentou correlações significativas, com a idade, CE, motilidade progressiva, defeitos totais com os percentuais de gametas normais, defeitos maiores e menores, defeitos de acrossoma. Observou-se correlação de pequena intensidade com a taxa de prenhez do rebanho ($r = 0,25$; $P < 0,05$), o que estaria de acordo com os resultados de estudos anteriores (DOBRINSKI et al., 1994; HALLAP et al., 2005). Entretanto, vários trabalhos demonstraram haver correlação alta e significativa entre a qualidade do DNA espermático com a idade (KARABINUS et al., 1990), com os defeitos primários e secundários, com a motilidade (BALLACHEY et al., 1988; SHIBAHARA et al., 2003; BELETTI & MELLO, 2004; PERIS et al., 2004), com a integridade de acrossoma, com a viabilidade espermática (BALLACHEY et al., 1988; PERIS et al., 2004) e com a fertilidade dos touros (BOCHENEK et al., 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2001). Todos esses estudos empregaram a citometria de fluxo e o protocolo de avaliação de estrutura da cromatina espermática. Essa técnica permite analisar um percentual de espermatozoides muitas vezes maior e detecta diferenças que não podem ser evidenciadas com a microscopia óptica (KARABINUS et al., 1990). Isto leva a considerar a influência de fatores extrínsecos, como sensibilidade da técnica (KARABINUS et al., 1990) e o tamanho da amostra, e principalmente de fatores intrínsecos, como o estado da espermatogênese desses touros aqui estudados (HALLAP et al., 2006) e o efeito do

plasma seminal agindo como uma barreira física ou ainda a maior fixação do DNA espermático

pelo formol, diminuindo o acesso do corante à cromatina (ROCHA et al., 2002).

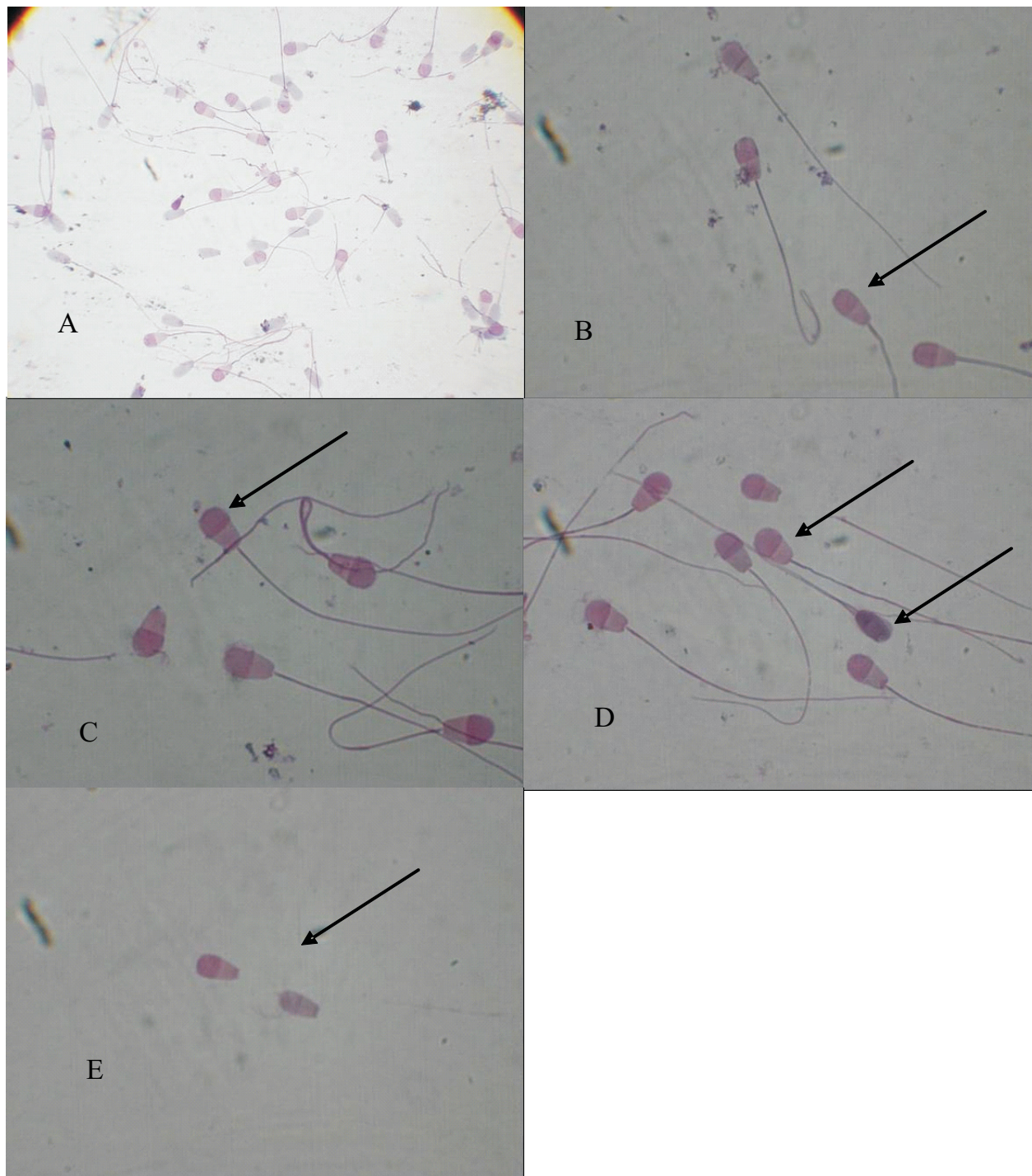


FIGURA 1. Fotomicrografia feita a partir de lâminas coradas por Trypan Blue e Giemsa (1000X) A) Espermatozoides vivos (rosa) mortos (azul) 400x. B) Espermatozoide com acrossoma normal. C) Espermatozoide com cabeça curta D) Marca superior espermatozoide com cabeça curta. Marca inferior dupla peça intermediária. E) Cabeças decapitadas inferior com defeito no acrossoma.

Analisando os dados entre as estações de monta (Tabela 2), notou-se que a CE não apresentou diferença ao longo dos anos. No entanto, no último ano (2005), o turbilhonamento sofreu redução, a motilidade apresentou valores equivalentes ao longo das estações, o vigor iniciou em 2003 uma trajetória de queda que se estendeu até a estação do ano de 2005, entretanto os valores dessas características seminais permaneceram dentro dos padrões de normalidade (CBRA, 1998). Trata-se de resultados que concordam com os de RODE et al. (1995), que verificaram alterações nas características físicas do sêmen e o aumento no percentual de defeitos morfológicos, em touros submetidos a dietas deficientes em vitamina A, confirmando os

efeitos deletérios, porém reversíveis, da carência nutricional sobre as características seminais (SILVA et al., 1992; RODE et al., 1995). Uma vez removida essa restrição nutricional no ano seguinte (2005), o percentual de gametas normais voltou a valores equivalentes aos do primeiro ano do experimento. Houve uma diferença significativa entre as porcentagens de prenhez observadas entre as estações reprodutivas de 2003 e 2004. Apesar de ter havido também diferenças entre os defeitos de cabeça, maiores e totais, não se acredita que elas possam ter modificado o quadro de prenhez do rebanho. Possivelmente, fatores diferentes a esses possam ter interferido.

TABELA 2. Características andrológicas, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e cromatina em touros Nelore por ano de estação de monta em uma propriedade de Cristalina, GO

Parâmetros	Estação de monta		
	2003	2004	2005
Idade	60,0 ± 15,1 b	69,6 ± 13,2 a	74,4 ± 23,3 a
Condição corporal	4,9 ± 0,6 a	5,1 ± 0,3 a	5,2 ± 0,4 a
Perímetro escrotal	34,3 ± 2,4 a	34,1 ± 2,9 a	33,1 ± 3,2 a
Turbilhonamento	3,2 ± 1,5 a	3,2 ± 1,4 a	1,6 ± 1,6 b
Motilidade progressiva	72,9 ± 13,3 a	76,5 ± 11,4 a	71,4 ± 16,1 a
Vigor	3,9 ± 0,8 a	3,2 ± 1,2 b	2,6 ± 1,0 b
Defeitos de acrossoma	5,6 ± 4,8 a	8,0 ± 7,6 a	3,3 ± 3,2 b
Defeitos de peça intermediária	1,9 ± 1,6 a	2,9 ± 3,5 a	2,2 ± 1,9 a
Defeitos de cabeça	5,4 ± 4,7 b	8,1 ± 5,5 a	3,8 ± 2,5 b
Defeitos de cauda	1,6 ± 1,3 a	1,7 ± 1,3 a	1,2 ± 1,3 a
Gota citoplasmática proximal	1,7 ± 1,8 a	1,8 ± 1,3 a	2,1 ± 2,4 a
Defeitos totais	14,6 ± 7,0 b	20,2 ± 9,5 a	12,1 ± 7,0b
Defeitos maiores	9,1 ± 5,0 b	13,6 ± 8,7 a	7,8 ± 5,5b
Defeitos menores	5,6 ± 4,8 ab	7,0 ± 5,2 a	4,3 ± 2,8b
Cromatina fragmentada	9,5 ± 4,1 a	9,2 ± 3,4 a	8,6 ± 3,9 a
Acrossoma ausente	36,7 ± 14,6 a	*	31,3 ± 14,4 a
EVAI	*	40,1 ± 23,1	*
EVAR	*	20,6 ± 14,6	*
EMAI	*	7,4 ± 5,7	*
EMAR	*	31,8 ± 23,0	*
Relação vaca-touro	40,9 ± 4,5 a	33,5 ± 7,3 a	*
Prenhez	75,7 A	64,4 B	*

EVAI: espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, EVAR: espermatozoides vivos com acrossoma reagido, EMAI: espermatozoides mortos com acrossoma íntegro, EMAR: espermatozoides mortos com acrossoma reagido, Re. T/F: relação touro-fêmea, Cat-Fem: categoria de fêmeas (none: novilhas Nelore, prime: primíparas Nelore, vane: vacas Nelore). (*): dados não disponíveis, letras diferentes minúsculas entre colunas P < 0,05 (SNK), letras maiúsculas, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (P < 0,05).

Na Tabela 3 estão apresentadas as características reprodutivas dos touros estudados de acordo com a categoria de fêmeas nos grupos de acasalamento. Houve diferença ($P < 0,05$) entre as porcentagens de prenhez observadas nas três categorias de fêmeas. Entre as características reprodutivas dos touros só os defeitos espermáticos de cabeça

foram diferentes ($P < 0,05$) entre as categorias de fêmeas, porém com valores perto do aceitável (8,6% nas primíparas). Estes achados levam a supor que a diferença de prenhez observada seja devida aos grupos de fêmeas e não às características estudadas nos touros que acasalaram elas.

TABELA 3. Características andrológicas, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e cromatina de touros Nelore em grupos por categoria de fêmeas em Cristalina, GO

Parâmetros	Categoria de fêmeas		
	Novilhas (8)	Primíparas (20)	Múltiparas (32)
Idade	73,7 ± 14,3 a	62,2 ± 13,2 a	62,4 ± 16,1 a
Condição corporal	4,4 ± 0,5 a	4,3 ± 0,5 a	4,5 ± 0,6 a
Perímetro escrotal	342,9 ± 37,7 a	334,2 ± 27,6 a	347,5 ± 24,8 a
Turbilhonamento	2,9 ± 1,3 a	3,0 ± 1,3 a	3,3 ± 1,5 a
Motilidade progressiva	63,6 ± 6,9 b	73,0 ± 12,3 a	75,6 ± 12,1 a
Vigor	3,3 ± 0,8 a	3,2 ± 1,1 a	3,8 ± 1,1 a
Defeitos de acrossoma	7,1 ± 7,0 a	7,1 ± 7,3 a	5,5 ± 4,6 a
Defeitos de peça intermediária	2,5 ± 2,0 a	3,0 ± 2,8 a	1,7 ± 1,2 a
Defeitos de cabeça	3,1 ± 1,7 b	8,5 ± 5,4 a	6,9 ± 5,9 ab
Defeitos de cauda	2,3 ± 0,4 a	1,5 ± 1,2 a	1,5 ± 1,2 a
Gota citoplasmática proximal	2,5 ± 2,8 a	1,1 ± 0,5 a	1,9 ± 1,9 a
Defeitos totais	14,3 ± 6,8 a	18,9 ± 9,3 a	16,0 ± 7,3 a
Defeitos maiores	10,9 ± 6,5 a	12,4 ± 7,8 a	9,2 ± 4,4 a
Defeitos menores	3,4 ± 1,7 a	6,9 ± 5,3 a	7,0 ± 5,4 a
Cromatina fragmentada	8,1 ± 4,9 a	10,1 ± 3,3 a	8,6 ± 3,6 a
Acrossoma ausente	30,1 ± 15,8 a	30,3 ± 9,3 a	37,7 ± 15,7 a
EVAI	49,8 ± 46,3 a	30,6 ± 16,8 a	51,8 ± 24,0
EVAR	13,8 ± 10,3 a	24,9 ± 13,7 a	16,1 ± 14,0 a
EMAI	5,8 ± 6,7 a	8,9 ± 5,9 a	7,5 ± 5,8 a
EMAR	30,8 ± 42,8 a	35,5 ± 18,7 a	24,6 ± 24,1 a
Relação vaca-touro	32,2 ± 16,6 b	39,9 ± 9,2 a	36,9 ± 5,2 ab
Prenhez	86,6 ± 8,2 ^A	51,0 ± 5,2 ^C	78,6 ± 4,1 ^B

EVAI: espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, EVAR: espermatozoides vivos com acrossoma reagido, EMAI: espermatozoides mortos com acrossoma íntegro, EMAR: espermatozoides mortos com acrossoma reagido, Re. T/F: relação touro-fêmea, Cat-Fem: categoria de fêmeas (none: novilhas Nelore, prine: primíparas Nelore, vane: vacas Nelore). (*): dados não disponíveis, letras diferentes minúsculas entre colunas $P < 0,05$ (SNK), letras maiúsculas, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES

As características reprodutivas dos touros permaneceram dentro de padrões aceitáveis ao longo de três anos de avaliação. Nos touros deste experimento, os defeitos espermáticos, a integridade de membrana plasmática, a integridade de acrossoma e a fragmentação de cromatina nuclear

não foram frequentes a ponto de comprometer a qualidade seminal e o desempenho reprodutivo dos animais. Não houve relação entre os defeitos espermáticos com a integridade acrossômica e/ou a fragmentação da cromatina nuclear. Não houve relação entre a prenhez com as características apresentadas pelos touros estudados.

REFERÊNCIAS

- BALLACHEY, B. E.; SAACKE, R. G.; EVENSON, D. P. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of sperm quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 2, p. 109-115, 1988.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa, 1989. 285 p.
- BELETTI, M. E.; MELLO M. L. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 398-402, 2004.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification on the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, n. 7-8, p. 383-391, 1973.
- BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.
- CBRA. **Procedimentos para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.
- DOBRIŃSKI, I.; HUGHES, H. P.; BARTH, A. D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 3, p. 531-538, 1994.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1039-1049, 1999.
- FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; DOOGAN, V. J.; FAVERI, J.; MILLER, R. G.; HOLROYD, R. G. Bull selection and use in Northern Australia. Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, v. 71, n. 1, p. 39-49, 2002.
- FRENEAU, G. E.; PUOLI, J. R.; BORJA, A. R. Índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP) em touros Nelore: estudo de estação de acasalamento em Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gnosis, [2000]. CD-ROM. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/2007/internas/cds_e_anais.html>.
- FRENEAU, G. E.; SILVA J. C. C.; CRUZ, G. C.; MIRANDA, S. M.; FERNANDES, M. K. F. Estudo de estação de monta em novilhas nelores (*Bos taurus indicus*) avaliadas pelo escore do trato reprodutivo (ETR) utilizando relação touro:fêmeas diferentes. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG, 5., Goiânia, 2008. **Anais...** Goiânia, 2008. p. 1597-1608. CD-ROM.
- FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**. Disponível em: <[doi:10.1016/j.anireprosci.2009.08.015](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.08.015)> (In Press. 2009).
- FRENEAU, G. E.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES JR. A. P.; MARIA, W. S. Puberdade em touros Nelore criados a pasto no Brasil: características corporais, testiculares, seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1107-1115, 2006.
- GALVANI, F. **Desempenho reprodutivo de touros de alta libido da raça Nelore**. 1998. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- HALLAP, T.; NAGY, S.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1752-1763, 2005.
- HALLAP, T.; JAAKMA, U.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 41, n. 3, p. 214-218, 2006.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 947-961, 2001.
- KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; BAER, R. K.; KAPROTH, M. T. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 9, 1990.
- KASTELIC, J. P.; COOK, R.; COULTER, G. H. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Veterinary Clinic of North America**, v. 13, n. 3, p. 271-282, 1997.

- MARTINEZ, M. L.; VERNEQUE, R. S.; TEODORO, R. L.; PAULA, L. R. O.; CRUZ, M.; CAMPOS, J. P.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, F.; BRUSCHI, J. H.; DURÂES, M. C. Correlações entre características da qualidade do sêmen e a circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, n. 3, v. 29, p. 700-706, 2000.
- PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 125-134, 2004.
- ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T. T.; AMORIM, D. A. Z. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2002.
- RODE, L. M.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P.; BAILEY, D. R. C. Seminal quality and sperm production in beef bulls with chronic dietary vitamin A deficiency and subsequent re-alimentation. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1269-1277, 1995.
- SALISBURY, G. W.; VANDEMARK, N. L.; LODGE, J. R. **Fisiologia de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1978. 831p.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis Systems**: user's guide. Version 6, Cary, NC: v. 2, 1 997. 1052 p.
- SHIBAHARA, H.; ONAGAWA, T.; JORSARAEI, S.; HIRANO, Y.; SUSUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; SUZUKI, M. Clinical significance of the acridine orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. **International Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 236-241, 2003.
- SILVA, A. E. D. F. **Reação acrossômica induzida**: método indicador de fertilidade do touro. Brasília: EMBRAPA – CNPRGB, 1998. 38 p. (Documento 35). Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/venda.html#documento>>.
- SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; CORDEIRO, C. M. T.; FREITAS, A. R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 3, v. 31, p. 1157-1165, 2002.
- TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.
- TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN, A.; MARIK, J. J.; FRIEDMAN, S. A test for practical evaluation of male fertility acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, n. 1, p. 87-91, 1984.
- WALTERS, A. H.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925-1937, 2005a.
- WALTERS, A. H.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1404-1421, 2005b.

Protocolado em: 28 fev. 2008. Aceito em: 1º set. 2009.