

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/7775**  
**IB/81273**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1987*

CARMEN DO MONTE DE CARVALHO BRITTO

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CITOQUÍMICAS DE  
ESPERMATOZÓIDES DE SÊMEN DE BOVINOS DE REBANHO  
DE ELITE E DE GADO "PÉ-DURO".

*Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da UNICAMP para ob-  
tenção do título de MESTRE em  
Ciências na área de Biologia  
Celular.*

*Prof. Dra. MARIA LUÍZA SILVEIRA MELLO  
-ORIENTADORA-*

CAMPINAS - SP  
-1987-

25m

*À memória de meu pai,  
ã minha mãe,*

*a meus tios: Camillo Filho  
e Terezinha,*

*ao meu esposo, Laurindo  
Jr. e ao meu filho Lau-  
rindo Neto*

*afetuosamente dedico  
este trabalho, esperando que se constitua numa pe-  
quena demonstração de quanto lhes sou grata, por  
tudo que me propiciaram alcançar.*

Classif	T/1102
Autor	B778c
V.	ex
Tembo BC	/7775
IB	/1102

B778c

18/81273  
B4/4775

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MARIA LUIZA DA SILVEIRA MELLO,  
pelos ensinamentos recebidos, cumulando-  
me de confiança para vencer esta difí-  
cil tarefa, pelo apoio, excelente orien-  
tação e constante estímulo na realiza-  
ção deste trabalho e por ter me dado a  
primeira oportunidade, participando com  
sua experiência para a minha formação ci-  
entífica, deixo aqui minha sincera gra-  
tidão.

- A G R A D E C I M E N T O S -

Ao DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, onde o presente trabalho foi realizado.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), através do PICD, pela concessão de uma bolsa de Mestrado que tornou possível a participação da autora no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular da UNICAMP.

À CENTRAL DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL LAGOA DA SERRA, sediada em Sertãozinho, Estado de São Paulo, na pessoa do Dr. JOSÉ DA FONSECA, pelas facilidades no uso de seu laboratório e pelo fornecimento de sêmen dos animais de elite.

À EMBRAPA/UEPAE de Teresina, na pessoa do Dr. JOSÉ HERCULANO DE CARVALHO, pelas facilidades na obtenção de sêmen de parte dos animais "pês-duros" bem como pelas valiosas informações e esclarecimentos a respeito desse gado.

Aos Senhores ANTONIO NORONHA PESSOA, JOÃO CLETO DE SOUZA e SINEZIO BARBOSA, fazendeiros nos municípios de Mon

Este trabalho recebeu financiamento  
do CNPq - Programa PIG-V -  
(407083/84).

- Í N D I C E -

	Páginas
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS . . . . .	1
1.1 - Gado Pê-duro: Problemática de extinção, pro- cedência e caracteres morfológicos . . . . .	7
2. MATERIAL . . . . .	15
2.1 - Rebanho de Elite (Touros de elevado nível zootécnico). . . . .	15
2.2 - Gado Pê-duro (Touros de grande rusticida- de). . . . .	16
3. MÉTODOS. . . . .	19
3.1 - Obtenção do sêmen. . . . .	19
3.2 - Fixação. . . . .	20
3.3 - Reações citoquímicas . . . . .	21
A - Reação de Feulgen . . . . .	21
B - Reação do "fast green" alcalino de Alfert e Geschwind, modificada por Deitch (1966) . . . . .	21
C - Basofilia após tratamento com solu- ção de azul de toluidina A pH 4,0 . . . . .	22
3.4 - Determinação da frequência de anomalias de forma de cabeça. . . . .	22
3.5 - Determinação de valores Feulgen-DNA. . . . .	23
3.6 - Determinação da frequência de diferentes respostas nucleares à reação do "fast green" alcalino . . . . .	23
3.7 - Comportamento nuclear frente a hidrólise ácida medido por alterações em caracterís- ticas de basofilia . . . . .	24
4. RESULTADOS . . . . .	25
4.1 - Frequência de anomalias de forma de cabe- ça . . . . .	25
4.1.1 - Rebanho de elite . . . . .	25
4.1.2 - Gado Pê-duro . . . . .	31
4.2 - Determinação de valores Feulgen-DNA. . . . .	36
4.2.1 - Rebanho de elite . . . . .	36
4.2.1.1 - Comparação geral entre os touros . . . . .	36
4.2.1.2 - Comparação dentro das es- pécies <i>Bos taurus</i> e <i>Bos</i> <i>indicus</i> . . . . .	58
4.2.1.3 - Comparação entre as espé- cies <i>Bos indicus</i> e <i>Bos</i> <i>taurus</i> . . . . .	62
4.2.2 - Gado Pê-duro . . . . .	66
4.2.2.1 - Comparação geral entre os touros . . . . .	66



4.2.3 - Comparação Pê-duro X Rebanho de elite . . . . .	90
4.3 - Determinação da frequência de diferentes respostas nucleares à reação do "fast green" alcalino . . . . .	97
4.3.1 - Rebanho de elite. . . . .	97
4.3.2 - Gado Pê-duro. . . . .	103
4.4 - Comportamento nuclear frente à hidrólise ácida, medido por alterações em características de basofilia. . . . .	107
4.4.1 - Rebanho de elite. . . . .	109
4.4.2 - Gado Pê-duro. . . . .	113
5. DISCUSSÃO . . . . .	117
5.1 - Considerações gerais. . . . .	117
5.2 - Anomalias de forma de cabeça dos espermatozoides: Informações adicionais. . . . .	119
5.3 - Valores Feulgen-DNA e o conteúdo de DNA dos espermatozoides de touro. . . . .	120
5.4 - Metacromasia nuclear induzida . . . . .	122
5.5 - O método do "fast green" alcalino e sua impropriedade para estudo de proteínas nucleares básicas de espermatozoides de touro . . . . .	124
6. CONCLUSÕES. . . . .	126
7. RESUMO. . . . .	128
8. SUMMARY . . . . .	130
9. BIBLIOGRAFIA. . . . .	132

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A incapacidade para fecundar devido a problemas relativos ao sêmen, está entre um dos maiores responsáveis por infertilidade em bovinos. Portanto, a determinação de características patológicas nas células do sêmen de touros é fundamental para o conhecimento do nível de fertilidade dos machos.

A incapacidade para fertilizar está diretamente relacionada com a produção espermática e viabilidade dos espermatozoides no ejaculado. É caracterizada pelo fato de que a prenhez não ocorre, apesar do touro realizar a monta de maneira normal, o que decorre de um insuficiente número de espermatozoides funcionais no ejaculado e/ou de um elevado percentual de espermatozoides morfologicamente anormais. Estas deficiências, geralmente, são causadas por sérias alterações e distúrbios funcionais que afetam os órgãos genitais do touro e que chegam a comprometer a sua capacidade fertilizante (LAGERLÖFF, 1936; 1938). Segundo GARCIA (1971) e VALE FILHO *et alii* (1978), havendo alto nível de patologia espermática no sêmen, com predominân-

*cia de anomalia de cabeça* dos espermatozoides, e dependendo também dos achados do exame semiológico dos órgãos genitais, do histórico e anamnese dos animais, pode-se ter um quadro da maturidade sexual, hipoplasia testicular, espermioogênese imperfeita ou degeneração testicular. Ainda segundo revisão de VALE FILHO *et alii* (1978), estas têm sido as principais causas da baixa fertilidade ou da infertilidade em touros, tanto em *Bos taurus* como em *Bos indicus* e em mestiços zebu-aurino. Todavia a degeneração testicular tem sido a causa mais comum da baixa fertilidade, tanto para os touros usados como reprodutores em criações extensivas, como para aqueles que são encaminhados às centrais de inseminação artificial como doadores de sêmen (LAGERLÖFF, 1938; VALE FILHO *et alii*, 1978). Tem sido também observado que, nos animais *Bos taurus* e nos mestiços zebu-aurino, a incidência dessa patologia é mais elevada que nos animais *Bos indicus*, conforme dados obtidos por VALE FILHO *et alii* (1978). Contudo, os touros afetados por degeneração testicular, têm um período variável de acasalamentos bem sucedidos, além do que, mesmo nos casos graves, onde o testículo infectado incha muito e não pode se mover na bolsa escrotal de maneira normal, o impulso sexual normal e a incapacidade de copular não são afetados (VALE FILHO *et alii*, 1978).

Touros férteis apresentam cerca de 90% de espermatozoides normais e 10 a 15% de espermatozoides mal formados; um sêmen que contenha uma alta porcentagem de espermatozoides anômalos, possui baixa capacidade fertilizante (LAGERLÖF, 1936, 1938; BLOM, 1950; BISHOP *et*

*alii*, 1954; BISHOP & HANCOCK, 1955; VALE FILHO *et alii*, 1978). Como regra, o número de espermatozoides anômalos no touro com boa fertilidade não excede 17 a 18% (LAGERLÖFF, 1936).

As anormalidades morfológicas dos espermatozoides podem ser: primárias, secundárias e terciárias. BLOM (1950) classificou os defeitos da cabeça, em comparação com os da porção média e da cauda como anormalidades espermáticas "*primárias*". Estas anormalidades "*primárias*" são originadas por distúrbios do processo de espermatogênese, devido a alterações patológicas nos testículos, em especial nos tubos seminíferos, enquanto as secundárias ocorrem durante a passagem dos espermatozoides através do epidídimo, em etapas posteriores ao desenvolvimento. Os danos causados aos espermatozoides durante ou após a ejaculação, ou durante as técnicas de manejo para inseminação artificial são designados como anormalidades terciárias. Geralmente, a fertilidade potencial é baixa quando uma alta porcentagem de espermatozoides apresentam anormalidades primárias e secundárias.

LAGERLÖFF (1936) e BLOM (1950) identificaram vários tipos de anormalidades da cabeça de espermatozoides, compreendendo desde cabeças muito pequenas a excessivamente grandes, curtas, estreitas e em forma de pera, cabeças isoladas do resto da estrutura (decaptação), perda ou distorção do acrossomo, enrugamento, cabeças deformadas e anormalmente coradas e cabeças duplas. BLOM, (1973) propôs nova sistemática para classificação dos defeitos espermáticos, denominando-os de maiores e menores, ao invés de

primários e secundários (BLOM, 1950). De acordo com revisão de VALE FILHO *et alii* (1978) e com respeito à patologia de cabeça, os defeitos maiores são: estreita na base, piriforme, contorno anormal, pequena anormal, decaptação, cauda enrolada na cabeça, coloração anormal, formações de vesículas ("pouch formation") e formas duplas. Os defeitos menores são: delgada, gigante (poliplóide), curta, larga e pequena normal. As alterações morfológicas ao nível dos espermatozoides são avaliadas, para o controle da fertilidade do touro e qualidade do sêmen, pela determinação do percentual destas anomalias no ejaculado. Ainda segundo VALE FILHO *et alii* (1978) a patologia espermática permissível para o congelamento do sêmen é: defeitos individualmente maiores até 5% e menores até 10%; total: maiores até 20% e menores até 25%; anormalidades totais: até 30%. Todavia, esta porcentagem de anormalidades morfológicas em espermatozoides de touro se reduz um pouco mais, conforme as citações de HERRICK & SELF (s.d.). Segundo estes autores, os touros de aceitável fertilidade não produzem espermatozoides com mais de 3-4% de cabeças anômalas, 4-10% de peças intermediárias defeituosas, 0,5-2% de caudas anormais e 0,5-6% de cabeças sem cauda, o que dá um total de 8 a 22% de anormalidades de forma dos espermatozoides.

É de se esperar também que a análise citoquímica de DNA e/ou de proteínas, a nível qualitativo e quantitativo em núcleos de espermatozoides morfológicamente normais ou com patologia de forma de cabeça, forneça dados adicionais sobre alterações no complexo DNA-proteína que pode-

riam comprometer a capacidade fecundante dos espermatozoides (GLEDHILL, 1966; EVENSON *et alii*, 1980; MELLO, 1982). O conteúdo de DNA na cromatina e os tipos de complexos DNA-proteína em espermatozoides de touro e de outros animais são fatores preponderantes na expressão do potencial de fertilização dos mesmos.

Hã descrições na literatura de casos em que o sêmen de touro é classificado como de alto nível de fertilidade, com espermatozoides exibindo normalidade de forma e motilidade, e no entanto se comportam como subfêrteis (GLEDHILL, 1966; 1970a; GLEDHILL *et alii*, 1966a). Embora o seu conteúdo de DNA seja normal, alguma alteração na proteína básica a ele complexada, durante os últimos estãgios da espermatogênese pôde ser sugerida (GLEDHILL *et alii*, 1966a, 1966b). Assim, com base em métodos citoquímicos, é possível constatar alterações no complexo DNA-proteína que ocorrem em espermatozoides morfológicamente normais (GLEDHILL, 1966, 1970a; GLEDHILL *et alii*, 1966a; EVENSON *et alii*, 1980; MELLO, 1982). Desse modo, a resposta à reação de FEULGEN pode aparecer alterada, ou seja, a depuração ser mais rápida (GLEDHILL, 1966). A fluorescência com alaranjado de acridina após denaturação térmica do DNA ou a metacromasia induzida após hidrólise ácida podem também espelhar a ocorrência de um complexo DNA-proteína mais frouxo (EVENSON *et alii*, 1980; MELLO, 1982).

A reação de Feulgen é o procedimento citoquímico mais conhecido e utilizado para as determinações quantitativas convencionais de DNA (MELLO & VIDAL, 1978). A nível

microespectrofotométrico podem ser detectados valores Feulgen-DNA e posteriormente fazer-se uma comparação destes valores entre si, na tentativa de se investigar a possibilidade de que núcleos normais de animais da mesma espécie, possam apresentar diferenças em valores Feulgen-DNA, devido a diferenças em complexação do DNA com proteínas (GLEDHILL, 1966; 1970a; MELLO & VIDAL, 1978).

A reação com "*fast green*" a pH 8,0-8,1 de ALFERT & GESCHWIND (1953), modificada por DEITCH (1966), por outro lado, é preferencial para demonstrar proteínas histônicas. No entanto, tem sido descrito que certos tipos de espermatozoides, como os de touro, especialmente quando fixados em formol, não reagem estequiometricamente ao método (ALFERT, 1956). Assim, seria de interesse estudar mais cuidadosamente a resposta dos espermatozoides de touro submetidos a diferentes tipos de fixação frente ao método do "*fast green*" alcalino.

A metacromasia induzida com azul de toluidina a pH 4,0 pode também ser usada como um método simples e rápido para se detectar anomalias no complexo DNA-proteína em cabeças de espermatozoides de touro de baixa fertilidade, uma vez que touros subfêrteis podem conter 12 vezes mais espermatozoides metacromáticos que os de alta fertilidade (MELLO, 1982).

O presente trabalho objetiva analisar a resposta a alguns métodos citoquímicos para complexos DNA-proteína em espermatozoides de touro, bem como objetiva determinar o percentual de anomalias morfológicas de cabeça dos espermatozoides em animais de rebanho de elite e em animais da

raça Pê-duro. Considerando que nestes últimos, as características ci  
tológicas não foram ainda descritas, e que o índice de reprodutivida  
de do rebanho piauiense tem sido relatado como baixo, cerca de 40%,  
conforme CENSO AGROPECUÁRIO/PIAUI (1980), houve interes-  
se em realizar tal estudo.

Tal tipo de estudo em espermatozoides de animais  
Pê-duro é de relevante importância, por se encontrar esta  
raça em franco processo de extinção, existindo atualmente  
um número muito limitado de animais em todo o Estado do  
Piauí, como também em outras regiões do Nordeste, confor-  
me CARVALHO & PEREIRA, 1981; CARVALHO, 1983a, 1983b, 1984.  
Qualquer trabalho que se faça com respeito a estes ani-  
mais, será de extrema importância, já que correm o risco  
de desaparecer sem que o homem tenha conhecido seu desem-  
penho real, através de observações sistemáticas e crite-  
riosas de suas características zootécnicas.

#### 1.1 - GADO PÊ DURO: PROBLEMÁTICA DE EXTINÇÃO, PROCEDÊNCIA E CARACTERES MORFOLÓGICOS

A introdução de outras raças, principalmente Zebus,  
mais produtivas sob condições de melhores pastagens, oca-  
sionou um desprezo generalizado pelo gado Pê-duro, esque-  
cendo-se sua excepcional rusticidade e a capacidade de  
utilizar pastagens naturais em locais adversos, onde ou-  
tros bovinos não se adaptam. Assim, os touros da raça Pê-  
duro ou Curraleiro são castrados sistematicamente e, tan-  
to machos como fêmeas, são os primeiros a serem descarta-  
dos pela maioria dos criadores. *"Essa extinção é motivada*



*principalmente por sua substituição por outras raças e através de cruzamentos absorventes com essas mesmas raças que, aos poucos, vão eliminando todo o sangue Pê-duro"* (CARVALHO, 1983a). Conseqüentemente, nos dias atuais, o gado piauiense é quase todo mestiço, originado principalmente dos cruzamentos entre animais Pê-duro X Zebu, cruzamentos estes seletivos e não sistemáticos que originam novos animais sem raça definida, e que, segundo ATHANASSOF (1958), constituem o tronco *Bos Zebu indicus*. Por outro lado, estes cruzamentos constituem um dos melhores recursos da pecuária tropical, pois existe uma tendência na Zootecnia moderna de reunir em um mesmo tipo bovino, as qualidades próprias do gado europeu (*Bos taurus*) e as do Zebu (*Bos indicus*), dando um produto bastante produtivo e de grande rusticidade e resistência às condições adversas do ambiente, conforme SANTIAGO (1965). Desse modo é que surgiram muitas raças, como por exemplo a Canchim, resultante do cruzamento entre Charolês X Zebu.

O gado Pê-duro, por ser uma raça naturalizada, que se desenvolveu em ambientes desfavoráveis poderá vir a constituir um banco genético valioso no futuro a ser utilizado por criadores e especialistas em melhoramento animal. Além disso, o grande interesse na preservação destes animais pela EMBRAPA/UEPAE de Teresina com o projeto para implantação de um núcleo de preservação do gado Pê-duro, se deve a que estes animais representam um "*produto secular da adaptação às severas condições ecológicas do Nordeste Brasileiro*" (CARVALHO, 1983a). É um gado altamente

resistente às condições ecológicas do meio (região nordestina), tanto com relação à alimentação, quanto à resistência a parasitas e doenças (CARVALHO & PEREIRA, 1981). Ainda segundo CARVALHO (1983a), "*na realidade, nenhum técnico ou criador lúcido irá propor a substituição de raças mais produtivas pelo Pé-duro em fazendas com abundância de boas pastagens cultivadas. Entretanto, nas drásticas condições ecológicas das pastagens naturais do agreste e caatingas nordestinas, dificilmente existirá uma raça que poderá competir com o Pé-duro. Aliás, numerosos criadores dão testemunhos favoráveis ao Pé-duro nessas condições. Afinal é preferível produzir pouco e sobreviver, a não produzir nada e perecer, como acontece com a maioria das raças nas mesmas condições. Além disso, o Pé-duro dá excelentes mestiços quando cruzado com outras raças*".

Os primeiros bovinos introduzidos no Brasil, eram oriundos de Portugal, e foram trazidos pelos colonizadores portugueses por volta da metade do século XVI. Estes bovinos pertenciam aos três troncos seguintes: *Bos taurus ibericus*, *Bos taurus aquitanicus* e *Bos taurus batavicus* (NOGUEIRA NETO, 1980). Segundo ATHANASSOF (1958), esses troncos deram origem aos seguintes tipos étnicos de bovinos nacionais:

1. Tronco *ibericus*: - Iguarapé, Curraleiro, Crioulo e Pantaneiro (gado médio ou pequeno, de estrutura variando de acordo com a fertilidade das terras da zona).
  - Nos rebanhos de gado Crioulo se originaram espontaneamente os bovinos nacionais:

- . gado mocho;
  - . gado de chifre de banana.
2. Tronco *aquitanicus*: - Caracū, Franqueiro, Junqueira e Pedreiro (gado de estatura acima da média, variando todavia de acordo com as condições do meio).
3. Tronco *batavicus*: - Tourino ou mestiços de holandês (gado leiteiro, de estatura média ou abaixo da média).

Os primeiros bovinos foram introduzidos no Piauí por volta de 1674, por Domingos Afonso Mafrense, membro da Casa D'Ávila, a partir do Rio São Francisco. Eles ocuparam inicialmente as regiões dos Rios Canindé, Tranqueiras, Piauí e Gurguêia, espalhando-se depois para o Norte. Os bovinos trazidos por Mafrense pertenciam aos tipos Crioulo e principalmente Curraleiro (NOGUEIRA NETO, 1980). Portanto, foram os tipos Curraleiro e Crioulo os principais responsáveis pela formação desse tipo de bovino que, comumente é denominado em geral, como "*Pê-duro*" (CARVALHO & PEREIRA, 1981).

As características morfológicas gerais do gado Pê-duro como também as peculiaridades inerentes dos representantes desta raça, são descritas a seguir de acordo com CARVALHO *et alii* (1983b).

Porte: os animais reprodutores deverão ter uma altura mínima de 1,24m e o peso mínimo de 380 kg, para os machos; 1,38m e 300 kg, respectivamente, para as fêmeas.

Conformação: cabeça pequena, perfil sub-côncavo, órbitas não muito salientes; chifres curtos e em forma de coroa, leves, apresentando secção circular, de cor clara na base e extremidade escura; orelhas pequenas, revestidas internamente de pêlos claros; boca grande e ventas largas; pescoço fino, barbela reduzida; tronco de conformação triangular, característica das raças leiteiras; peito profundo, ventre volumoso, ancas largas, garupa direita; cauda fina, longa e bem inserida, sendo tolerável a inserção alta; vassoura preta, membros delgados e bem proporcionados.

Pelagem: amarela, amarela avermelhada ou baía com extremidades escuras até o fusco, não muito carregado; os pêlos das entre-nãdegas e axilas devem ser de tonalidade clara ou esbranquiçada, bem como do baixo-ventre. Cabeça de tonalidade escura, acentuando-se no chanfro e em torno dos olhos; focinho preto com barba de pêlos claros. Membros de cor escura, tonalidade mais pronunciada na região da canela, especialmente nos membros anteriores, onde pode elevar-se até acima dos joelhos, podendo ser mais escura, nos touros; unhas pretas.

Ubre: bem conformado e de boa textura.

Alguns dados de medidas do porte e médias de peso de representantes desta raça, acham-se descritos nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - MEDIDAS DO PORTE DE BOVINOS DE "RAÇAS NATURALIZADAS" (TROVO\*, 1985) EMBRAPA/CENARGEN - RELATÓRIO DE PROJETO DE PESQUISA (DADOS NÃO PUBLICADOS).

GRUPAMENTO GENÉTICO	COMPRIMENTO DO CORPO (cm)		ALTURA DO POSTERIOR (cm)		COMPRIMENTO DA GARUPA (cm)		LARGURA DA GARUPA (cm)		ALTURA DO ANTERIOR (cm)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Caracú	171	149	141	130	54	48	58	54	145	130
Mochó Nacional	150	156	128	129	50	48	55	54	132	131
Crioulo Lageano	171	147	136	128	52	47	54	50	141	127
**Curraleiro	128	123	116	108	42	40	38	39	110	108

OBS.: M = macho;

F = fêmea.

\*\*Curraleiro = gado Pé-duro

\*TROVO, José Benedito F. (1985), Comunicação Pessoal.

TABELA 2 - MÉDIAS DE PESO DE BOVINOS DA RAÇA PE-DURO (CARVALHO\*, 1986) - EMBRAPA/  
FAZENDA EXPERIMENTAL OCTÁVIO DOMINGUES / SÃO JOÃO DO PIAUÍ.

CATEGORIA	NÚMERO DE ANIMAIS	P E S O (em Kg)	
		$\bar{X}$	S
Machos ao nascer	5	19,30	3,99
Fêmeas ao nascer	11	17,02	2,38
Crias em geral (machos e fêmeas) ao nascer	16	17,73	3,04
Touros	9	337,31	54,89
Vacas	35	228,59	36,03

\*CARVALHO, José Herculano de (1986), Comunicação Pessoal.

Observa-se que o porte dos bovinos Curraleiros apresenta-se bem menor que o dos demais, o que se deve provavelmente e, em grande parte, à ação da seleção natural em condições precárias, sobretudo nutricionais, do ambiente que ocorre na região nordestina (TROVO\*, 1985).

Portanto, frente ao relato exposto acima, este material reveste-se de importância significativa para o estudo proposto neste trabalho, ou seja, uma análise de características morfológicas e citoquímicas de espermatozoides de gado Pê-duro ou Curraleiro, comparadas às de animais considerados de rebanho de elite.

---

\*TROVO, José Benedito F. (1985), Comunicação Pessoal.

## 2. MATERIAL

### 2.1 - REBANHO DE ELITE (TOUROS DE ELEVADO NÍVEL ZOOTÉCNICO)

Foram obtidas amostras de sêmen de cinco animais *Bos taurus* e cinco *Bos indicus*, todos doadores de sêmen na Central de Inseminação Artificial da Agropecuária Lagoa da Serra Ltda. (Sertãozinho - São Paulo).

#### IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

ESPECIE ANIMAL	CÓDIGO ANIMAL	CÓDIGO LÂMINA
<i>Bos taurus</i>	431	3
" "	762	4
" "	770	6
" "	437	7
" "	855	8
<i>Bos indicus</i>	829	1
" "	730	2
" "	616	5
" "	280	9
" "	719	10



## 2.2 - GADO PÊ-DURO (TOUROS DE GRANDE RUSTICIDADE)

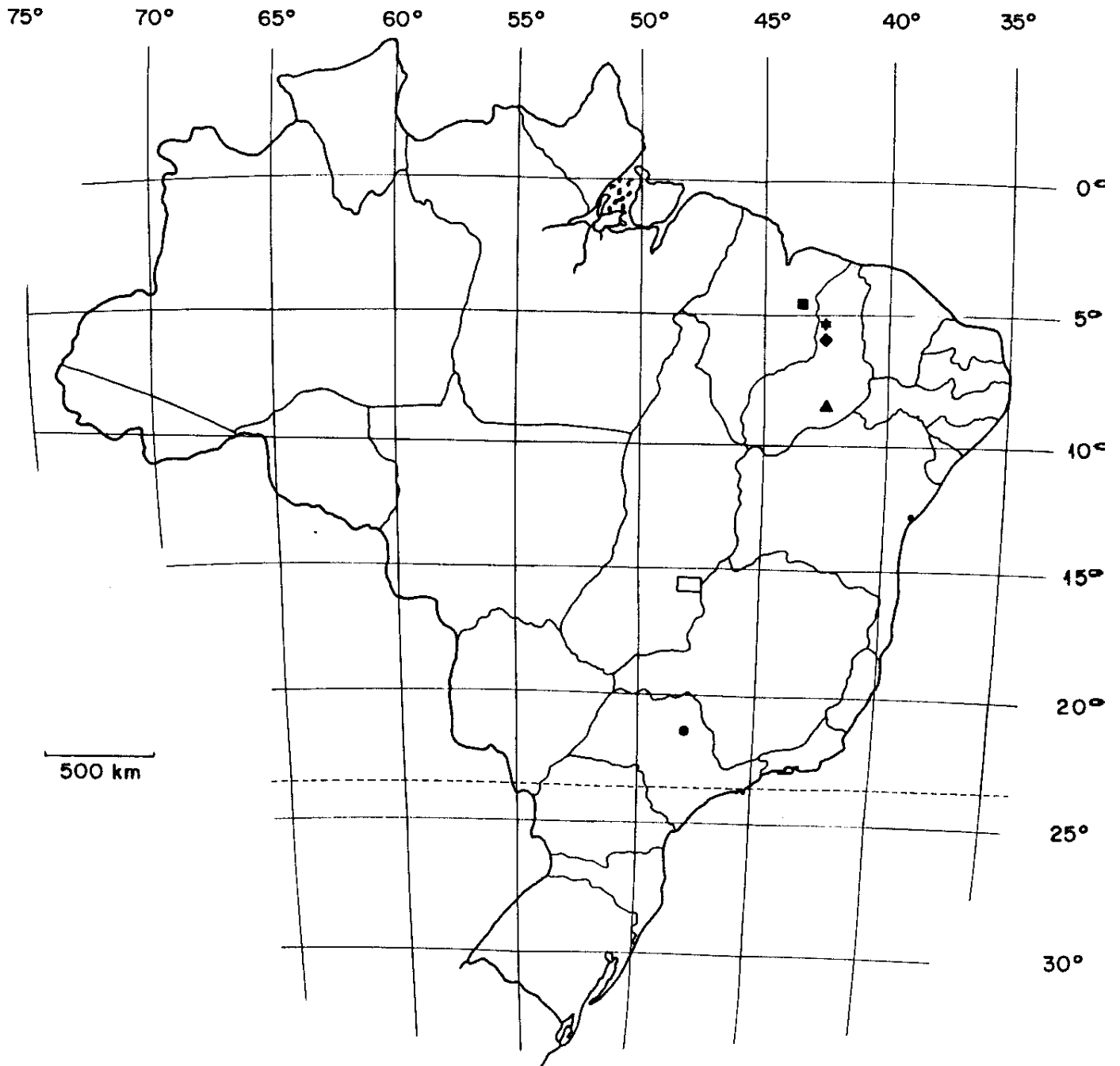
Amostras de sêmen de touros nativos do Estado do Piauí, pertencentes à espécie *Bos taurus* e à raça Pê-duro ou Curraleiro, foram obtidas de nove animais nos seguintes municípios: São João do Piauí (EMBRAPA/Fazenda Experimental Octávio Domingues), Monsenhor Gil, Altos e Caxias (Maranhão). Amostras de sêmen de um touro mestiço, descendente do cruzamento absorvente entre Pê-Duro X Zebu, também obtidas no município de Monsenhor Gil. A localização das regiões de coleta das amostras pode ser visualizada no Esquema 1. Aspectos representativos do gado Pê-duro e gado mestiço podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

### IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO ANIMAL	CÓDIGO LÂMINA
Pê-duro	104	1
" "	115	2
" "	118	3
" "	-	4
" "	-	5
" "	-	6
" "	-	7
" "	-	8
" "	-	9
Mestiço (SRD)*	-	10

Apenas os touros 1, 2 e 3 tinham codificação, porque pertenciam ao Núcleo de Preservação do Gado Pê-duro (EMBRAPA/Pi).

\* SRD = Sem raça definida.



LEGENDA

- Caxias - MA
- ◆ Altos - PI
- ◆ Monsenhor Gil - PI
- ▲ S. João do Piauí - PI
- Sertãozinho - SP

Esquema 1 - Locais de coleta de sêmen de touros de rebanho de elite (●) e de gado Pé-duro (■, ◆, ▲).

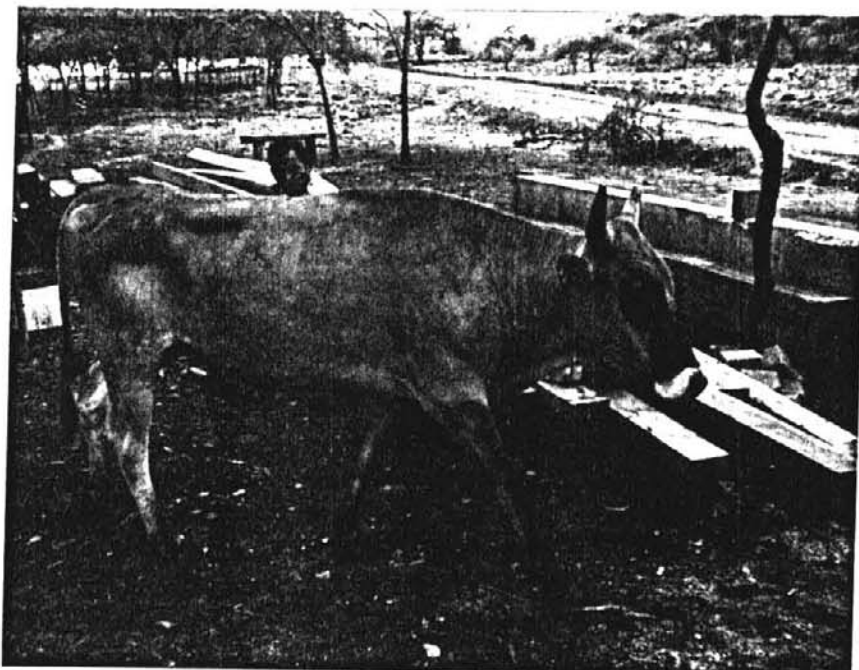


Figura 1  
Exemplar de ga  
do Pê-duro, com  
4 anos de ida  
de e pesando  
261,0 kg. em  
10/7/85. O ani  
mal possui pe  
lagem vermelha  
clara e extre  
midades pre  
tas (Touro nº  
2).

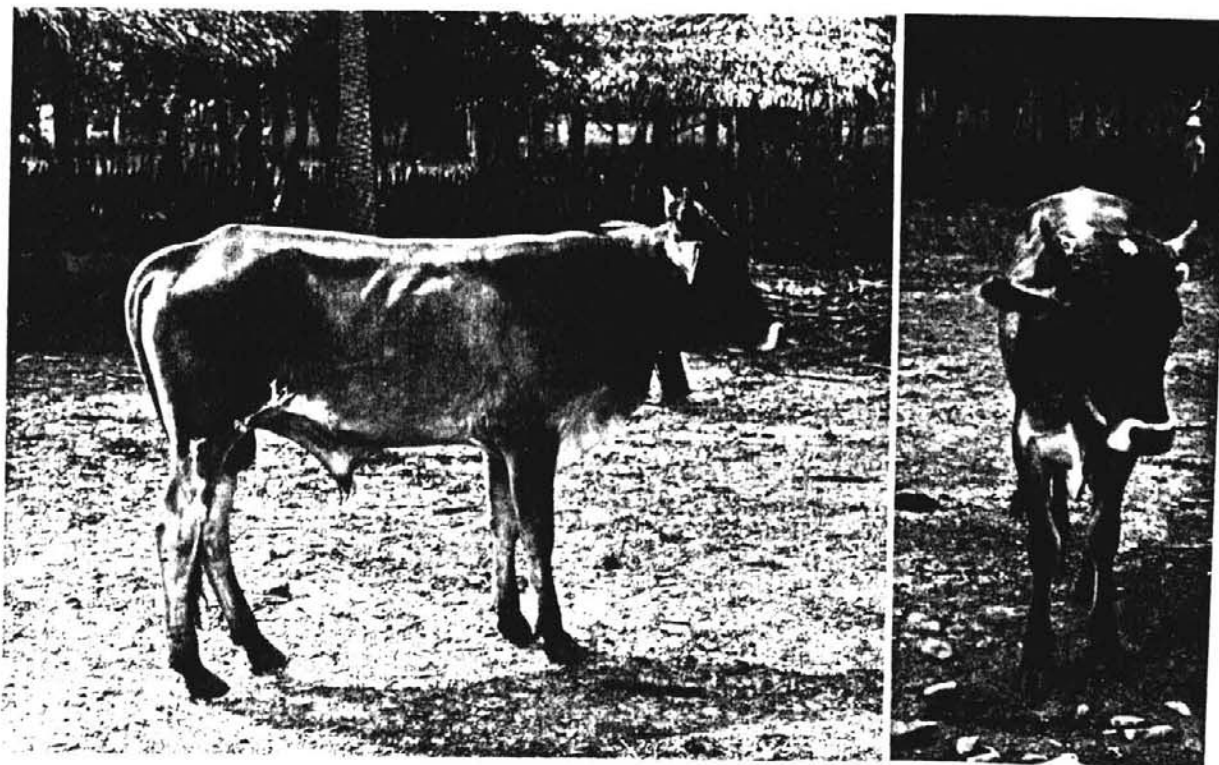


Figura 2 - Exemplar de gado mestiço de Pê-duro X Zebu, provavelmente da raça Nelore, com aproximadamente 3 anos de idade e pesando 280 kg em 05/2/85. O animal possui pelagem fusca e extremidades pretas; apresenta maior tamanho, membros mais compridos, cabeça e orelhas maiores, barbela e baínha mais desenvolvidas (Touro nº 10).

### 3. M É T O D O S

#### 3.1 - OBTENÇÃO DO SÊMEN

A obtenção do sêmen dos touros de rebanho de elite foi efetuada pela técnica de vagina artificial, sem nenhuma dificuldade, naturalmente porque todos os animais foram treinados para a monta artificial.

A obtenção do sêmen do gado Pê-duro ou Curraleiro, por outro lado, apresentou muitas dificuldades. Estando a raça em franco processo de extinção, a criação desses animais quase não existe mais, apenas poucos e pequenos criadores conservam ainda alguns representantes desse gado, elementos estes de pouca idade e que já apresentam na sua grande maioria características de mestiço, oriundas de cruzamentos absorventes com o gado Zebu. Outras dificuldades foram: o regime extensivo de criação destes animais, que são criados soltos em grandes extensões de área à procura de pastagens, o que dificultou muito o trabalho do vaqueiro no intento de prendê-los. Como os animais são de

grande rusticidade, houve necessidade do emprego do método de eletroejaculação para a obtenção do ejaculado.

A não resposta ao método de eletroejaculação foi apresentada por alguns animais devido à pouca idade dos mesmos, pois no caso do touro Pê-duro, animal de pequeno porte e pequena exigência alimentar, o amadurecimento sexual pode ser um pouco mais tardio (seis meses mais tarde). A dificuldade na obtenção do sêmen foi maior ainda, porque, no momento em que os touros da raça Pê-duro atingem a puberdade, são logo castrados e posteriormente abatidos. Este comportamento dos grandes e pequenos produtores provocou a extinção quase total do gado Pê-duro.

Imediatamente, após a obtenção do ejaculado, tanto na primeira, como na segunda amostra, foram pingadas gotas de sêmen sobre lâminas histológicas e realizados os esfregaços. Estes foram fixados e posteriormente encaminhados aos procedimentos citoquímicos.

### 3.2 - FIXAÇÃO

Parte dos preparados foi fixada em etanol: ácido acético 3:1 por 1 min. e parte em formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2M a pH 7,4 durante 10 minutos.

### 3.3 - REAÇÕES CITOQUÍMICAS

#### A - REAÇÃO DE FEULGEN

Os esfregaços fixados em etanol: ácido acético foram hidrolisados em HCl 4 N a 25<sup>0</sup>C durante uma hora, tempo considerado ótimo para a depuração total do DNA (SILVA & MELLO, 1986). A seguir, foram lavados em água destilada e tratados com reativo de Schiff à temperatura ambiente, durante 40 min. Após a coloração, foram lavados com três banhos de água sulfurosa (metabissulfito de sódio : HCl 1N: água destilada:1: 1:18) (5 min. cada) e um banho de água destilada. Finalmente, foram desidratados, diafanizados e montados em bálamo do Canadá.

#### B - REAÇÃO DO "FAST GREEN" ALCALINO DE ALFERT E GESCHWIND, MODIFICADA POR DEITCH (1966)

Amostras dos preparados fixados em etanol-ácido acético e formaldeído, foram tratadas com TCA a 5% recém-preparado, durante 15 min. a 90<sup>0</sup>C, mergulhadas em TCA a 5%, recém-preparado, frio, e a seguir várias vezes em água destilada. Então, foram coradas com solução de "fast green" a pH 8,1 durante 30 min. e lavadas diversas vezes em água destilada, desidratadas em etanol 95% (2 a 5 min. cada) ,

diafanizada em xilol e montadas em bálamo do Canadá.

#### C - BASOFILIA APÓS TRATAMENTO COM SOLUÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA A pH 4,0

Os preparados fixados em etanol ácido-acético, após hidrólise ácida em HCl 4N a 25°C durante 10, 15 e 20 min., foram tratados com solução de azul de toluidina em tampão McIlvaine a pH 4,0 durante 15 min., lavados em água rapidamente, secados, diafanizados e montados em bálamo do Canadá, segundo método de MELLO (1982).

#### 3.4 - DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ANOMALIAS DE FORMA DE CABEÇA

Nas lâminas submetidas à reação de Feulgen, procedeu-se à contagem de núcleos, normais e anômalos, em vinte campos tomados ao acaso, para a determinação da frequência de espermatozoides com anomalias morfológicas de cabeça. Com os dados obtidos (frequência absoluta), determinou-se a frequência percentual, individual e total, de tipos de anomalias de forma de cabeça dos espermatozoides, em cada ejaculado. As observações foram efetuadas em microscópio binocular Zeiss.

### 3.5 - DETERMINAÇÃO DE VALORES FEULGEN-DNA

Foram determinados, em unidades arbitrárias, os valores Feulgen-DNA de núcleos normais e anômalos de espermatozoides escolhidos ao acaso. As medidas foram efetuadas com um microespectrofotômetro de varredura automática Zeiss, associado a um computador (Fonte informática). As condições de operação foram as seguintes:  $\lambda = 575 \text{ nm}$ ; objetiva 100/1,25; optovar 2,0; diafragma de medida  $d = 0,1 \text{ mm}$ ; condensador Zeiss LD-Epiplan 16/0,30 e passos de varredura:  $0,5 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$ . Ao nível dos preparados, vinte espermatozoides normais e aproximadamente vinte anômalos foram medidos para a determinação dos valores Feulgen-DNA.

### 3.6 - DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DIFERENTES RESPOSTAS NUCLEARES À REAÇÃO DO "FAST GREEN" ALCALINO

Nas lâminas, submetidas à reação do "fast green" alcalino, procedeu-se à contagem, em vinte campos tomados ao acaso, de núcleos normais e anômalos, para a determinação da frequência de diferentes comportamentos, no que se refere à resposta ao método do "fast green" alcalino.



### 3.7 - COMPORTAMENTO NUCLEAR FRENTE A HIDRÓLISE ÁCIDA MEDIDO DO POR ALTERAÇÕES EM CARACTERÍSTICAS DE BASOFILIA

As lâminas, tratadas com solução de azul de toluidina a pH 4,0, foram analisadas em microscópio Zeiss, para a determinação da frequência de núcleos metacromáticos, segundo o teste de metacromasia induzida em espermatozoides de touro, de MELLO (1982).

## 4. R E S U L T A D O S

Os tipos de anomalias de forma de cabeça de espermatozoides, consideradas neste trabalho, acham-se representados no Esquema 2 e Figura 3.

### 4.1 - FREQUÊNCIA DE ANOMALIAS DE FORMA DE CABEÇA

#### 4.1.1 - REBANHO DE ELITE

Conforme observações da Tabela 3, a maioria dos animais estudados apresentou baixo índice de patologia de cabeça (1,5 a 5,3% em *Bos taurus* e 1,4 a 9,8% em *Bos indicus*), com exceção de dois animais *Bos taurus* e um *Bos indicus* que apresentaram índices de 15,2 a 21%. De modo geral, a presença de enrugamento nuclear foi rara (máximo, 0,4%).

As Tabelas 4 e 5 mostram os dados de anomalia de cabeça analisados por consideração individual de tipos (4)

ESQUEMA 2. CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE ANOMALIAS DE CABEÇA SEGUNDO VALE FILHO et alii (1978)

DEFEITOS MAIORES



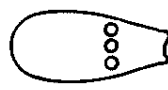
ESTREITA NA BASE



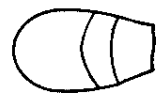
PIRIFORME



CONTORNO ANORMAL

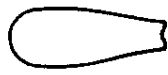


"POUCH FORMATION"



COLORAÇÃO ANORMAL

DEFEITOS MENORES



DELGADA



GIGANTE ( POLIPLÓIDE )



PEQUENA NORMAL



CURTA



LARGA

Figura 3 - Tipos de anomalias de forma de cabeça de espermatozoides de touro, analisadas neste trabalho, segundo VALE FILHO *et alii* (1978) e BLOM (1950), em esfregaço de sêmen submetido à reação de Feulgen. X 4.400.

- A = controle normal;
- B = piriforme;
- C = gigante;
- D = larga;
- E = estreita na base;
- F = "pouch formation"
- G = contorno anormal;
- H = pequena normal;
- I = curta;
- J = coloração anormal
- L = enrugada;
- M = delgada.

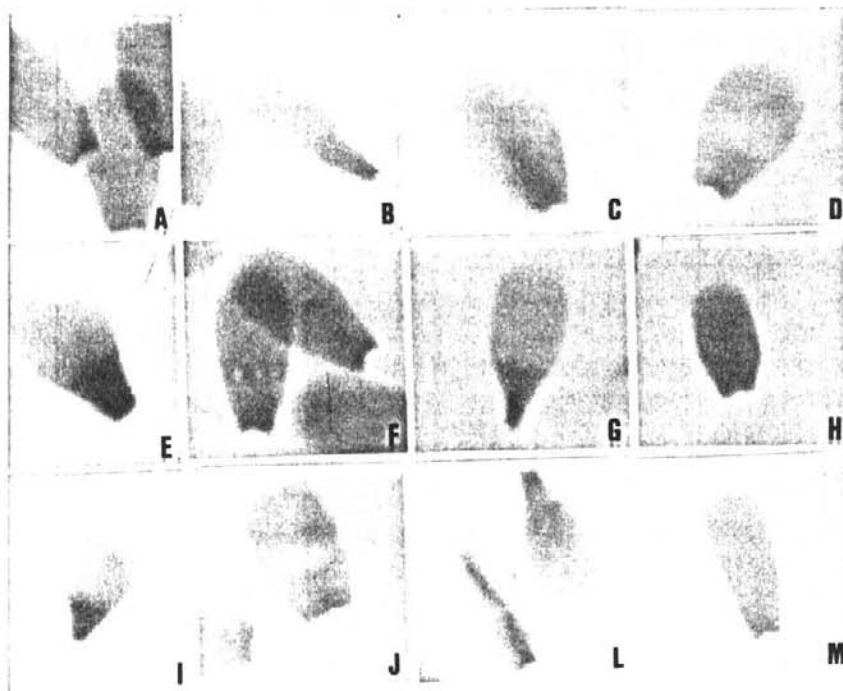


Figura 3 - Tipos de anomalias de forma de cabeça de espermatozoides de touro, analisadas neste trabalho, segundo VALE FILHO *et alii* (1978) e BLOM (1950), em esfregaço de sêmen submetido à reação de Feulgen. X 4.400.

- A = controle normal;
- B = piriforme;
- C = gigante;
- D = larga;
- E = estreita na base;
- F = "pouch formation"
- G = contorno anormal;
- H = pequena normal;
- I = curta;
- J = coloração anormal
- L = enrugada;
- M = delgada.

TABELA 3 - FREQUÊNCIA ABSOLUTA (f.a) E PERCENTUAL (f.%) GERAL DE NÚCLEOS NORMAIS E ANÔMALOS SEGUNDO VALE FILHO *et alii* (1978) E DADOS DE ENRUGAMENTO NUCLEAR SEGUNDO BLOM (1950) REFERENTES A ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN.

ESPECIE	CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS	NÚCLEOS NORMAIS		NÚCLEOS ANÔMALOS		ENRUGAMENTO NUCLEAR		OBSERVAÇÕES
			f.a	f.%	f.a	f.%	f.a	f.%	
<i>Bos taurus</i>	A	212	174	82,1	38	17,9	-	-	: Normozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	253	209	82,6	44	17,4	-	-	
"	A	820	805	98,2	12	1,5	3	0,4	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	716	695	97,1	20	2,8	1	0,1	
"	A	225	217	96,4	8	3,5	-	-	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	322	305	94,7	17	5,3	-	-	
"	A	819	801	97,8	18	2,2	-	-	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	837	820	98,0	16	1,9	1	0,1	
"	A	592	481	81,2	110	18,6	1	0,2	: Normozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	747	591	79,1	155	20,7	1	0,1	
<i>Bos indicus</i>	A	262	243	92,7	19	7,2	-	-	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	428	386	90,2	42	9,8	-	-	
"	A	787	772	98,1	14	1,8	1	0,1	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	692	680	98,3	11	1,6	-	-	
"	A	291	230	79,0	61	21,0	-	-	: Normozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	552	468	84,8	84	15,2	-	-	
"	A	290	286	98,6	4	1,4	-	-	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	279	271	97,1	7	2,5	1	0,3	
"	A	266	260	97,7	6	2,2	-	-	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	253	242	95,6	11	4,4	-	-	

OBS.: - = Não observado; Normozoospermia = concentração espermática normal.



TABELA 5 - FREQUÊNCIA PERCENTUAL TOTAL (FT) DE TIPOS DE ANOMALIAS DE FORMA DE CABEÇA DE ESPERMATOZÓIDES EM TOUROS DE REBANHO DE ELITE CLASSIFICADAS EM DEFEITOS MAIORES E MENORES DE ACORDO COM VALE FILHO *et alii*(1978).

ESPECIE	CÓDIGO DAS LÂMINAS	DEFEITOS MAIORES		DEFEITOS MENORES	
		FT	TIPO PREDOMINANTE	FT	TIPO PREDOMINANTE
<i>Bos taurus</i>	A 3 B	17,5 15,0	Estreita na base	0,5 2,4	Larga
" "	A 4 B	0,5 1,1	Estreita na base	1,0 1,7	Pequena normal
" "	A 6 B	- -	Não observado	3,5 5,3	Pequena normal
" "	A 7 B	- -	Não observado	2,2 2,0	Pequena normal
" "	A 8 B	16,1 16,8	Estreita na base	2,5 3,9	Curta
<i>Bos indicus</i>	A 1 B	5,4 6,3	"Pouch formation"	1,9 3,5	Pequena normal
" "	A 2 B	0,5 0,6	Estreita na base	1,3 0,9	Pequena normal
" "	A 5 B	20,3 14,5	"Pouch formation"	0,7 0,7	Pequena normal
" "	A 9 B	0,3 -	Estreita na base	1,0 2,5	Pequena normal
" "	A 10 B	1,5 2,0	"Pouch formation"	0,7 2,4	Larga



ou pelo total de presença dos mesmos (5). Com base nesses dados, deduz-se que dois touros *Bos taurus* e um *Bos indicus* apresentaram altos valores de defeitos maiores individuais (9,3 a 12,6% de cabeças estreitas na base e 13,9 a 19,6 de "pouch formation" (Tabela 4) e que estão muito acima dos níveis aceitos como normais (5%) (VALE FILHO *et alii*, 1978). Os mesmos animais, no entanto, não apresentaram níveis elevados de defeitos menores de cabeça (Tabela 4).

Os valores altos de defeitos maiores individuais contribuíram para valores totais aparentemente elevados em anomalias de cabeça (14,5 a 20,3%) (Tabela 5). No entanto, com referência a este último parâmetro, aceitam-se dentro da normalidade valores de até 20% (VALE FILHO *et alii*, 1978).

No total da amostra, o tipo predominante de anomalia de cabeça para os defeitos maiores foi estreita na base e para os defeitos menores foi pequena normal (Tabela 5).

#### 4.1.2 - GADO PÉ-DURO

Dos animais analisados foram detectados altos índices de patologia de cabeça ( $> 20\%$ ) apenas em preparados provenientes de dois animais (Tabela 6). A frequência de enrugamento nuclear, por outro lado, foi alta, especialmente no mestiço, comparada à total ausência dessa anomalia.

TABELA 6 - FREQUÊNCIA ABSOLUTA (f.a) E PERCENTUAL (f.%) GERAL DE NÚCLEOS NORMAIS E ANÔMALOS, SEGUNDO VALE FILHO *et alii* (1978) E DADOS DE ENRUGAMENTO NUCLEAR SEGUNDO BLOM (1950) EM ESPERMATOZÓIDES DE TOURO DA RAÇA PE-DURO SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN.

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS	NÚCLEOS NORMAIS		NÚCLEOS ANÔMALOS		ENRUGAMENTO NUCLEAR		OBSERVAÇÕES
			f.a	f. %	f.a	f. %	f.a	f. %	
Pê-duro	A	484	383	79,1	95	19,7	6	1,2	: Normozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	396	309	78,0	84	21,2	3	0,8	
Pê-duro	A	135	128	94,8	7	5,2	-	-	: Oligozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	183	174	95,1	8	4,4	1	0,5	
Pê-duro	A	616	459	74,5	141	22,9	16	2,6	: Normozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	547	406	74,2	123	22,5	18	3,3	
Pê-duro	A	624	607	97,2	11	1,8	6	1,0	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	618	599	97,0	13	2,0	6	1,0	
Pê-duro	A	562	547	97,3	10	1,8	5	0,9	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	625	608	97,3	9	1,4	8	1,3	
Pê-duro	A	46	44	95,7	2	4,3	-	-	: Oligozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	37	33	89,2	4	10,8	-	-	
Pê-duro	A	590	569	96,4	20	3,4	1	0,2	: Normozoospermia : Frequência baixa de anômalos
	B	641	595	92,8	26	4,1	20	3,1	
Pê-duro	A	30	27	90,0	3	10,0	-	-	: Oligozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	34	30	88,2	4	11,8	-	-	
Pê-duro	A	50	43	86,0	7	14,0	-	-	: Oligozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	41	34	82,9	7	17,1	-	-	
*SRD Mestiço	A	391	326	83,4	41	10,5	24	6,1	: Normozoospermia : Frequência alta de anômalos
	B	443	358	80,8	62	14,0	23	5,2	

\*SRD=Sem raça definida; - = Não observado; Normozoospermia = concentração espermática normal; Oligozoospermia = baixa concentração espermática.

lia em touros de rebanho de elite.

Com relação aos defeitos maiores de cabeça considerados individualmente, cinco touros apresentaram valores altos (especialmente "*pouch formation*" e coloração anormal)(Tabela 7). A anomalia do tipo coloração anormal, foi detectada apenas em três animais Pês-duros e no mestiço , descendente de Pê-duro X Zebu (Tabela 7).

Da mesma forma que para os animais de rebanho de elite, os valores totais de anomalias de forma de cabeça (defeitos maiores em separado dos defeitos menores), raramente excederam 20% (Tabela 8). Neste caso, se tratava de defeitos maiores, com predominância da anomalia coloração anormal (Touro nº 3) (Tabela 8). No total da amostra, o tipo predominante de anomalia de cabeça, para os defeitos maiores foi "*pouch formation*" e para os defeitos menores foi larga (Tabela 8).

TABELA 7. FREQUÊNCIA ABSOLUTA (a) E PERCENTUAL (%) DE TIPOS DE ANOMALIAS DE FORMA DE CABEÇA CLASSIFICADAS EM DEFEITOS MAIORES E DEFEITOS MENORES DE ACORDO COM VALE FILHO et alii(1978)(ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO SUBMETIDOS A REAÇÃO DE FEULGEN).

RAÇA DOS TOUROS	CÓDIGO DAS LAMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS	DEFEITOS MAIORES						DEFEITOS MENORES							
			Estreito na base	Piriforme	Contorno anormal	"Pouch formation"	Coloração anormal	Delgada	Gigante	Curta	Larga	Pequena normal				
			a	%	a	%	a	%	a	%	a	%	a	%		
PÉ-DURO 1	A	484	7	1.4	6	1.2	70	14.5	3	0.6	2	0.4	7	1.4	—	—
	B	396	5	1.3	4	1.0	65	16.4	5	1.3	—	—	5	1.3	—	—
PÉ-DURO 2	A	135	—	—	—	—	1	0.7	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	183	1	0.5	—	—	4	2.2	—	—	1	0.5	1	0.5	—	—
PÉ-DURO 3	A	613	19	3.1	5	0.8	2.3	3.7	75	12.2	2	0.3	1	0.2	3	0.5
	B	547	14	2.6	5	0.9	10	2.0	59	10.8	3	0.5	7	1.3	9	1.6
PÉ-DURO 4	A	624	1	0.2	—	—	1	0.2	5	0.8	3	0.5	—	—	1	0.2
	B	618	1	0.2	—	—	1	0.2	7	1.1	3	0.5	—	—	1	0.2
PÉ-DURO 5	A	562	1	0.2	—	—	4	0.7	—	—	1	0.2	3	0.5	—	—
	B	625	1	0.2	—	—	3	0.5	—	—	2	0.3	2	0.3	1	0.2
PÉ-DURO 6	A	46	2	4.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	37	2	5.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
PÉ-DURO 7	A	590	1	0.2	—	—	15	2.5	1	0.2	—	—	—	—	2	0.3
	B	641	4	0.6	—	—	18	2.8	1	0.2	—	—	—	—	2	0.3
PE-DURO 8	A	30	—	—	—	—	2	6.6	—	—	—	—	—	1	3.3	—
	B	34	—	—	—	—	3	8.8	—	—	—	—	—	—	—	—
PÉ-DURO 9	A	50	—	—	—	—	7	14.0	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	41	—	—	—	—	7	17.1	—	—	—	—	—	—	—	—
* SRD MESTIÇO	A	391	4	1.0	3	0.8	2	0.5	25	6.4	2	0.5	1	0.3	2	0.5
	B	443	5	1.1	6	1.4	1	0.2	40	9.0	3	0.7	1	0.2	4	0.9

\* SRD = SEM RAÇA DEFINIDA ; — = NÃO OBSERVADO

TABELA 8 - FREQUÊNCIA PERCENTUAL TOTAL (FT) DE TIPOS DE ANOMALIAS DE FORMA DE CABEÇA DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO CLASSIFICADAS EM DEFEITOS MAIORES E DEFEITOS MENORES DE ACORDO COM VALE FILHO *et alii* 1978.

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	DEFEITOS MAIORES		DEFEITOS MENORES	
		FT	TIPO PREDOMINANTE	FT	TIPO PREDOMINANTE
Pê-duro	A	17,1	"pouch formation"	2,4 2,6	Larga
	B	18,7			
Pê-duro	A	0,7	"pouch formation"	4,4 1,5	Curta
	B	2,7			
Pê-duro	A	21,6	Coloração anormal	1,3 4,3	Larga
	B	18,1			
Pê-duro	A	1,2	Coloração anormal	0,7 0,7	Delgada
	B	1,5			
Pê-duro	A	0,9	"pouch formation"	0,9 0,8	Gigante (poliplóide)
	B	0,7			
Pê-duro	A	4,3	Estreita na base	5,4	Pequena normal
	B	5,4			
Pê-duro	A	2,9	"pouch formation"	0,5 0,5	Larga
	B	3,6			
Pê-duro	A	6,6	"Pouch formation"	3,3 2,9	Larga
	B	8,8			
Pê-duro	A	14,0	"Pouch formation"	-	Não observado
	B	17,1			
*SRD Mestiço	A	8,7	Coloração anormal	1,8 2,3	Larga
	B	11,7			

OBS.: - = Não observado; \*SRD = Sem raça definida.

## 4.2 - DETERMINAÇÃO DE VALORES FEULGEN-DNA

### 4.2.1 - REBANHO DE ELITE

#### 4.2.1.1 - COMPARAÇÃO GERAL ENTRE OS TOUROS

As Tabelas 9 e 10 mostram os valores Feulgen-DNA médios obtidos para núcleos morfológicamente normais e anômalos. Os núcleos anômalos medidos foram escolhidos ao acaso, sem intencionalidade de procura de um tipo definido de anomia. Com respeito aos valores Feulgen-DNA médios obtidos para o total de núcleos normais medidos, houve uma variação com amplitude  $a=6,26$ . A dispersão nos dados foi maior para o touro 8, a seguir para os touros 9 e 5 (Tabela 9). Nos demais, os desvios padrões indicaram uma menor variação. O cálculo do coeficiente de variação confirmou maior variabilidade para os valores Feulgen-DNA de núcleos normais pertencentes ao touro 8 (Tabela 9). Como o coeficiente de variação não ultrapassou 10%, isso indica uma aceitável homogeneidade nos dados. O Esquema 3 mostra os intervalos de confiança ao nível de 95% para os valores Feulgen-DNA médios de núcleos normais, obtidos com base no desvio padrão  $S=3,42$ .

No caso dos valores Feulgen-DNA médios obtidos para os núcleos anômalos de cada touro, a variação (amplitude de  $a=16,2$ ) bem como os desvios padrões, intervalos de con-

TABELA 9 - VALORES FEULGEN-DNA EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE (N = número de medidas = 20) .

ESPECIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)
<i>Bos indicus</i>	1	38,34	+	1,95	5,09
<i>Bos indicus</i>	2	36,67	+	1,33	3,63
<i>Bos taurus</i>	3	34,37	+	1,92	5,59
<i>Bos taurus</i>	4	36,53	+	1,40	3,83
<i>Bos indicus</i>	5	37,42	+	2,04	5,45
<i>Bos taurus</i>	6	35,85	+	1,60	4,46
<i>Bos taurus</i>	7	38,64	+	1,95	5,05
<i>Bos taurus</i>	8	36,58	+	2,46	6,72
<i>Bos indicus</i>	9	37,65	+	2,35	6,24
<i>Bos indicus</i>	10	32,38	-	1,79	5,52

ESQUEMA 3 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S=3,42.

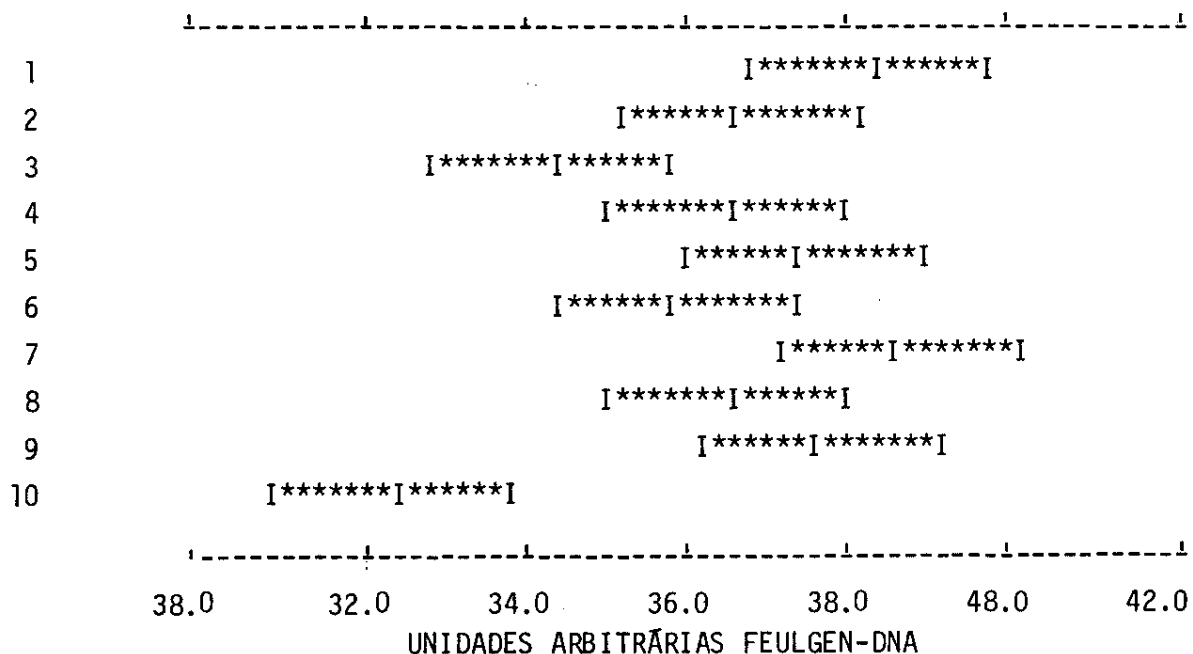
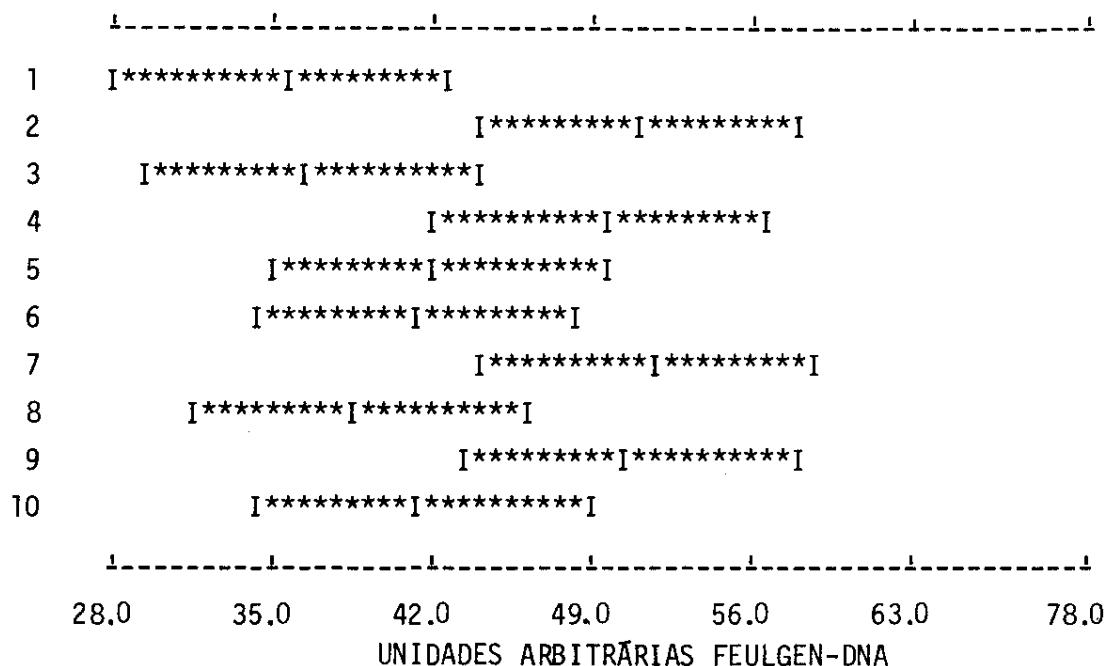


TABELA 10 - VALORES FEULGEN-DNA EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE (N = número de medidas = 20).

ESPECIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)
<i>Bos indicus</i>	1	35,4	$\pm$	5,1	14,41
<i>Bos indicus</i>	2	51,1	$\pm$	22,1	43,25
<i>Bos taurus</i>	3	36,6	$\pm$	7,0	19,13
<i>Bos taurus</i>	4	49,6	$\pm$	21,0	42,34
<i>Bos indicus</i>	5	42,3	$\pm$	14,3	33,81
<i>Bos taurus</i>	6	41,3	$\pm$	14,1	34,14
<i>Bos taurus</i>	7	51,6	$\pm$	20,1	38,95
<i>Bos taurus</i>	8	38,6	$\pm$	10,2	26,42
<i>Bos indicus</i>	9	50,7	$\pm$	23,4	46,15
<i>Bos indicus</i>	10	41,6	$\pm$	16,5	39,66

ESQUEMA 4 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S=16,53.





fiança e coeficientes de variação foram mais elevados (Tabela 10; Esquema 4). Neste caso, como o coeficiente de variação, no geral, ultrapassou 30%, demonstra-se uma grande heterogeneidade entre os dados, o que era de se esperar, dados os tipos diferentes de anomalias agrupadas. Com base em análise de variância (Tabelas 11 e 12) pode-se afirmar que existe uma diferença significativa ao nível de 1% entre os valores Feulgen-DNA, tanto para os núcleos morfológicamente normais como para os anômalos.

TABELA 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES FEULGEN-DNA DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	641,5	71,3	6,18*
Resíduo	190	2219,9	11,7	
TOTAL	199	2861,4		

F(0,01) crítico = 2,50

\*Significante

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES FEULGEN-DNA DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	7184,0	798,22	2,92*
Resíduo	190	51910,0	273,21	
TOTAL	199	59094,0		

F(0,01) crítico = 2,50

\*Significante

As Tabelas 13 e 14 salientam os valores médios de área em  $\mu\text{m}^2$  para núcleos morfologicamente normais e anômalos, respectivamente. Com respeito aos valores médios obtidos para os núcleos normais, houve uma variação com amplitude  $a=5,21$ . O coeficiente de variação se estendeu de 4,5 a 9,95%, não sendo, portanto, superior a 10%, indicando assim uma aceitável homogeneidade entre os dados. Os intervalos de confiança para esses dados se encontram no Esquema 5.

No caso dos valores médios de área dos núcleos anômalos de cada touro, a variação foi mais elevada, do que a

TABELA 13 - ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR ( $\mu\text{m}^2$ ) DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN (N = nº de medidas = 20).

ESPECIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V. (%)
<i>Bos indicus</i>	1	37,25	$\pm$	2,16	5,80
<i>Bos indicus</i>	2	38,36	$\pm$	1,75	4,56
<i>Bos taurus</i>	3	34,26	$\pm$	3,41	9,95
<i>Bos taurus</i>	4	37,54	$\pm$	2,01	5,35
<i>Bos indicus</i>	5	36,56	$\pm$	2,56	7,00
<i>Bos taurus</i>	6	36,09	$\pm$	1,63	4,52
<i>Bos taurus</i>	7	36,46	$\pm$	2,47	6,77
<i>Bos taurus</i>	8	35,16	$\pm$	2,15	6,11
<i>Bos indicus</i>	9	37,47	$\pm$	1,96	5,23
<i>Bos indicus</i>	10	39,47	$\pm$	2,40	6,08

ESQUEMA 5 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S=2,30.

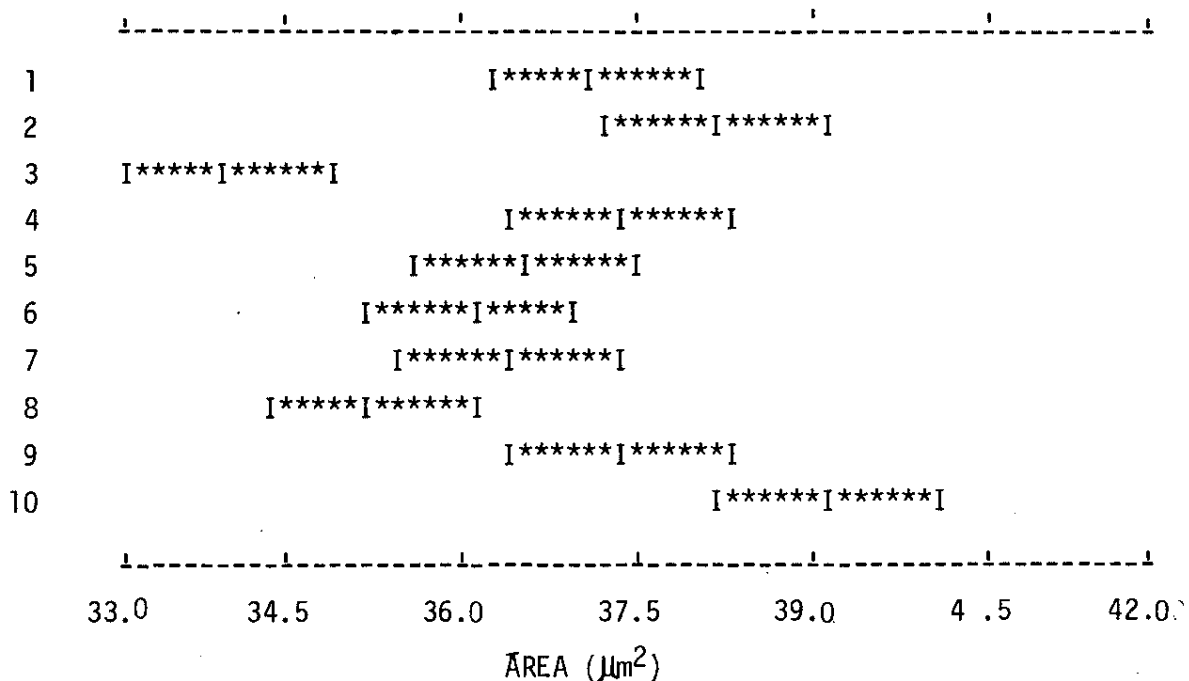
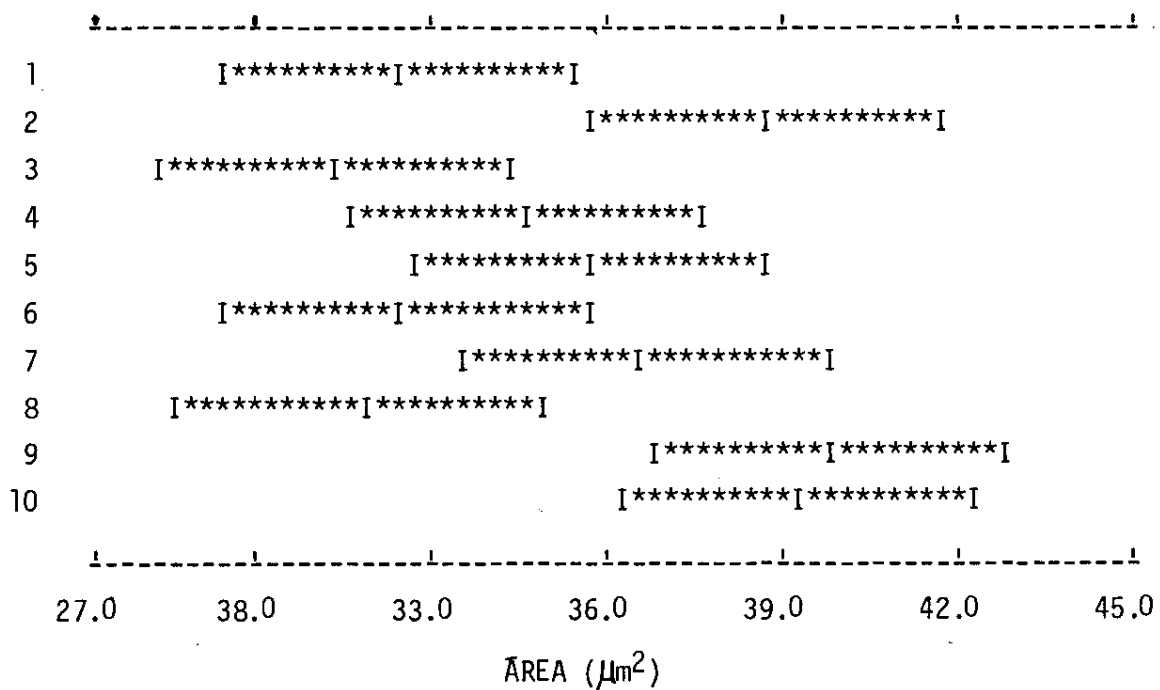


TABELA 14 - ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR ( $\mu\text{m}^2$ ) DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN (N = nº de medidas = 20).

ESPECIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)
<i>Bos indicus</i>	1	32,75	$\pm$	6,42	19,60
<i>Bos indicus</i>	2	39,70	$\pm$	11,49	28,94
<i>Bos taurus</i>	3	31,44	$\pm$	4,01	12,75
<i>Bos taurus</i>	4	35,16	$\pm$	9,70	27,59
<i>Bos indicus</i>	5	36,30	$\pm$	4,44	12,23
<i>Bos taurus</i>	6	31,63	$\pm$	6,67	21,09
<i>Bos taurus</i>	7	36,13	$\pm$	9,60	26,57
<i>Bos taurus</i>	8	31,08	$\pm$	4,24	13,64
<i>Bos indicus</i>	9	39,60	$\pm$	8,96	22,63
<i>Bos indicus</i>	10	39,03	$\pm$	6,03	15,45

ESQUEMA 6 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S=7,58



verificada em núcleos normais, de forma semelhante ao que ocorreu com os valores Feulgen-DNA médios, o que pode ser constatado pela amplitude  $a=8,62$ . Os desvios padrões e os coeficientes de variação confirmam esta afirmativa. Considerando-se toda a amostragem, o coeficiente de variação se estendeu de 12,23 a 28,94%. O Esquema 6 apresenta os intervalos de confiança para os dados descritos na Tabela 14. Da mesma forma que para os valores Feulgen-DNA, a análise de variância aplicada aos dados de área (Tabelas 15 e 16) demonstrou existir uma diferença significativa entre os núcleos morfológicamente normais e entre os anômalos.

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE ÁREA NUCLEAR DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.I.	Q.M.	F
Tratamentos	9	410,99	45,67	8,63*
Resíduo	190	1005,99	5,29	
TOTAL	199	1416,98		

F(0,01) crítico = 2,50

\*Significante

TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE ÁREA NUCLEAR DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.I.	Q.M.	F
Tratamentos	9	2124,0	236,0	4,11*
Resíduo	190	10914,0	57,4	
TOTAL	199	13037,9		

F(0,01) crítico = 2,50

\*Significante

A correlação entre os valores médios: Feulgen-DNA e área absorvente nuclear, foi investigada através do método de Pearson, tanto para os núcleos morfologicamente normais como para os anômalos. Os resultados, no caso dos núcleos normais, demonstraram correlação significativa, exceto para os touros 4 e 10 (Tabela 17). Por outro lado, a correlação entre todos os valores foi significativa, apesar do valor baixo de  $r$  (Tabela 17). Além disso, núcleos morfologicamente anômalos, demonstraram correlação significativa em todos os casos (Tabela 18). Da mesma forma, a correlação envolvendo todos os valores foi significativa, com um valor alto para  $r$  (0,782), indicando que estes valores estão 61,15% correlacionados.

TABELA 17 - CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS VALORES FEULGEN-DNA X ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR DE NÚCLEOS  
NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE.

HIPÓTESES	TOUROS	COEFICIENTE	GL	SIGNIFICÂNCIA	DECISÃO
$H_0: \rho=0$	1	0.528	18	S	Rejeita-se $H_0$
$H_1: \rho \neq 0$	2	0.738	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	3	0.785	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	4	0.333	18	NS	Aceita-se $H_0$
	5	0.593	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	6	0.673	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	7	0.732	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	8	0.615	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	9	0.572	18	SS	Rejeita-se $H_0$
	10	0.280	18	NS	Aceita-se $H_0$
CORRELAÇÃO TOTAL		0.271	198	SS	Rejeita-se $H_0$ Aceita-se $H_1$

OBS.: SS = significante a P.0.01  
 S = significante a P.0.02  
 NS = não significante  
 r (0,01) crítico 18 = 0,561  
 para os GL: 100 = 0,254





A correlação entre os valores Feulgen-DNA x área absorvente nuclear para cada touro pode ser também visualizada através da análise dos gráficos 1 a 10. A cada ponto no gráfico foi associada a forma nuclear respectiva (normal ou anômala). Para todos os animais analisados, a população nuclear normal se distribuiu em região equivalente dos gráficos. O mesmo não ocorreu com respeito aos núcleos anormais, os quais se distribuíram inhomogeneamente de acordo com os tipos de patologia de cabeça apresentados. Dois grupos bem distintos são representados pelos núcleos gigantes (poliplóides) e pelos micro-espermatozóides. Os núcleos gigantes apresentaram valores que os caracterizam como diplóides. Apenas um núcleo gigante observado no touro 9, exibiu valor Feulgen-DNA e área acima do que se esperava para o estado diplóide (Gráfico 9) o que contribuiu para o elevado coeficiente de variação desse touro (Tabela 9). Quanto aos micro-espermatozóides medidos, em geral exibiram valores Feulgen-DNA e área nuclear sensivelmente menores que os núcleos normais (Gráficos 1,2,4,5). Nos touros 4 e 6, no entanto, foram encontrados micro-espermatozóides cuja área nuclear era reduzida, porém o conteúdo Feulgen-DNA era muito semelhante ao de núcleos normais (Gráficos 4 e 6), sugestivo de ocorrência de um grau de compactação cromatínica adicional àquele já existente em espermatozóides normais.

Gráfico 1 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro (Bos indicus)

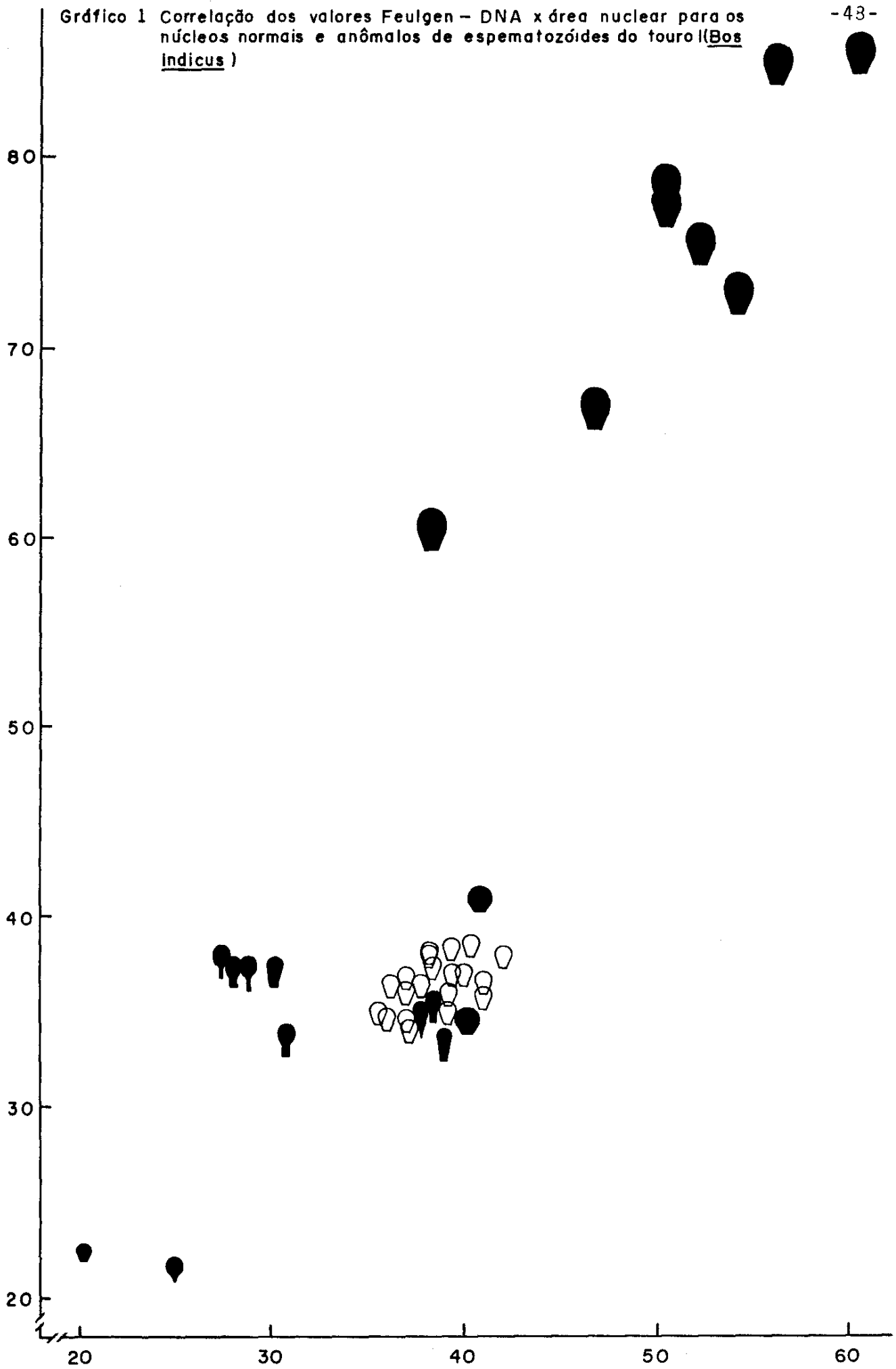


Gráfico 2. Correlação dos valores Feulgen-DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 2 (Bos indicus)

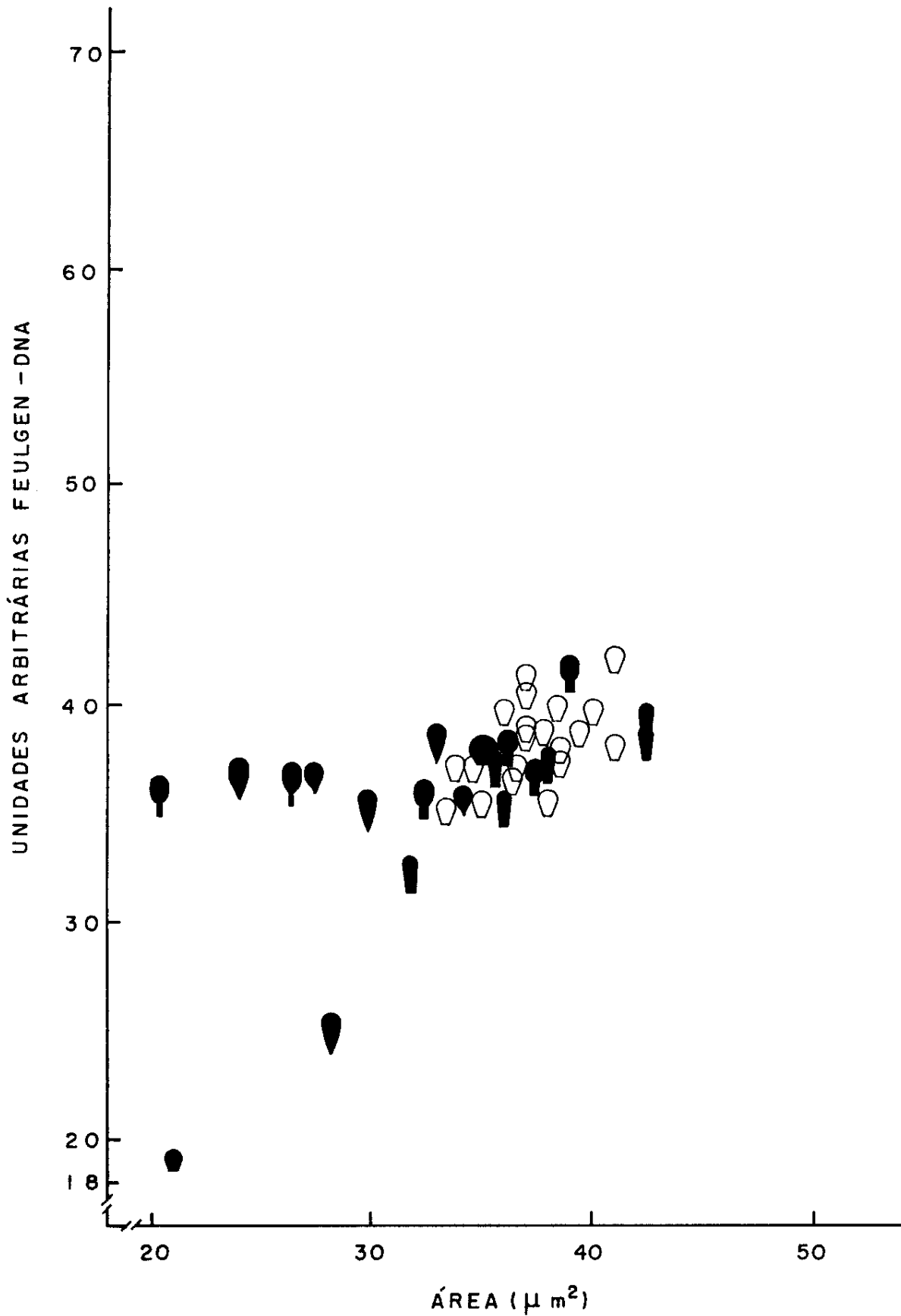


Gráfico 3. Correlação dos valores Feulgen-DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 3 (Bos taurus)

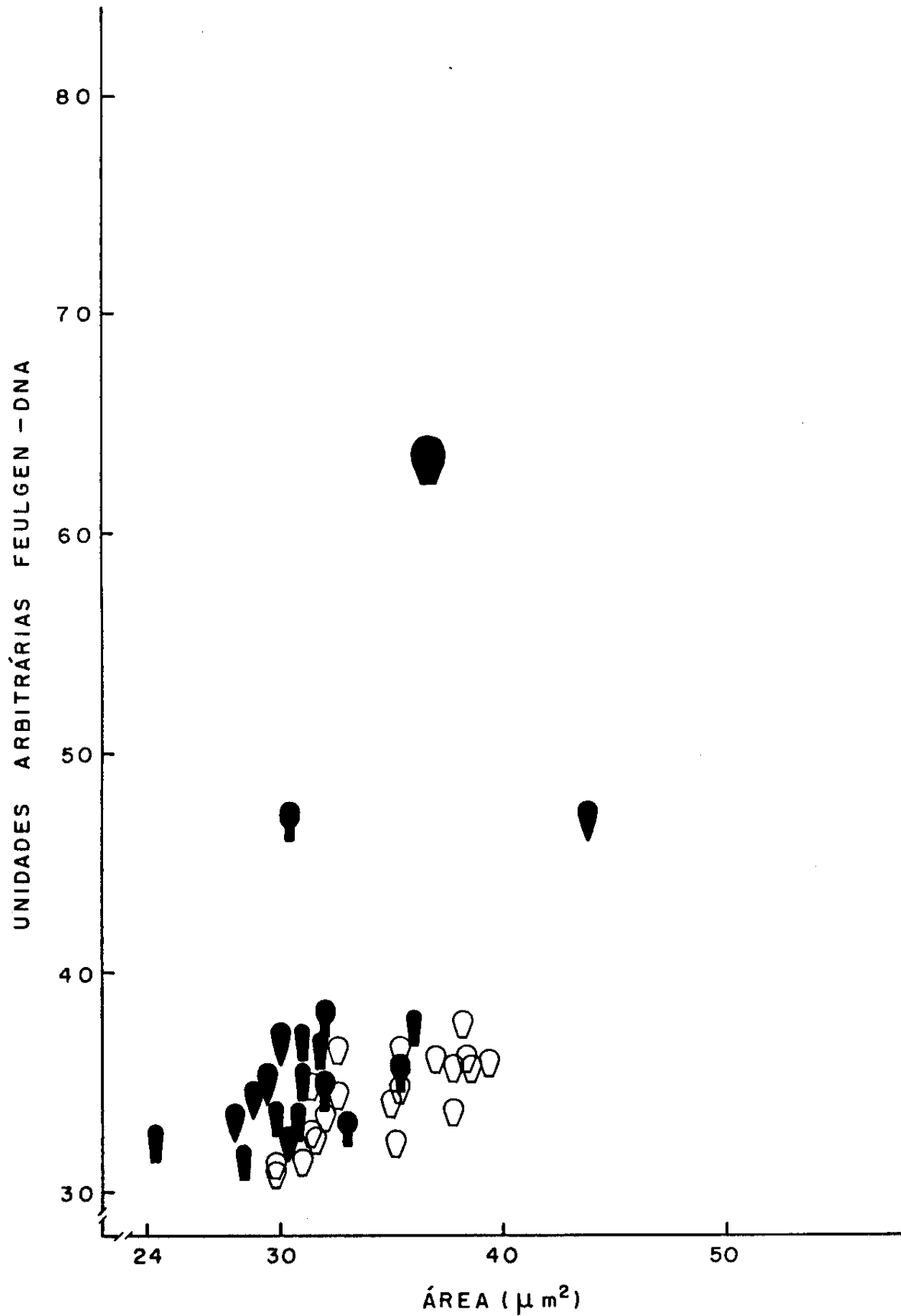


Gráfico 4 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anô-  
malos de espermatozóides do touro 4 (Bos  
taurus)

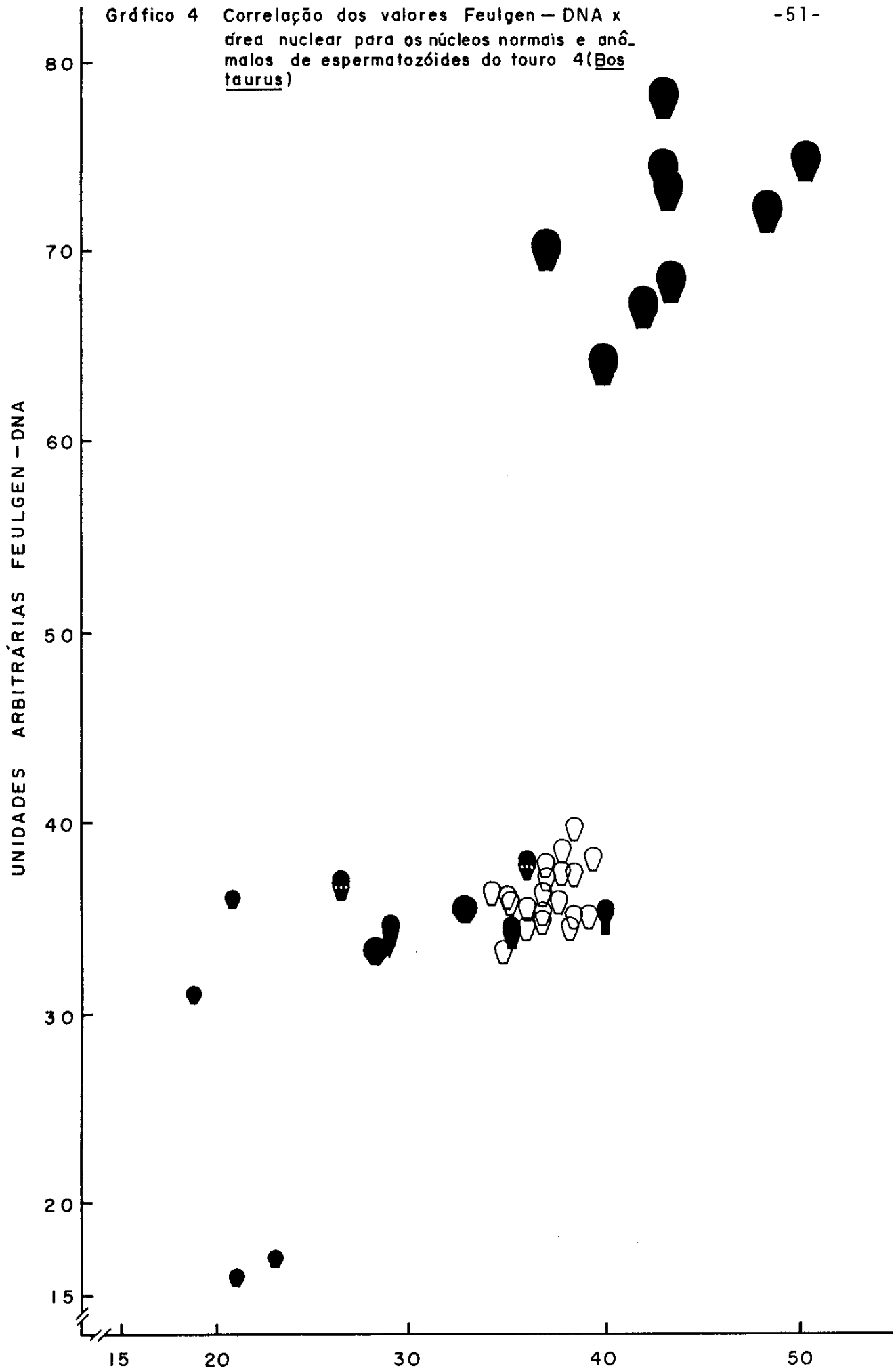


Gráfico 5 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 5 (Bos Indicus)

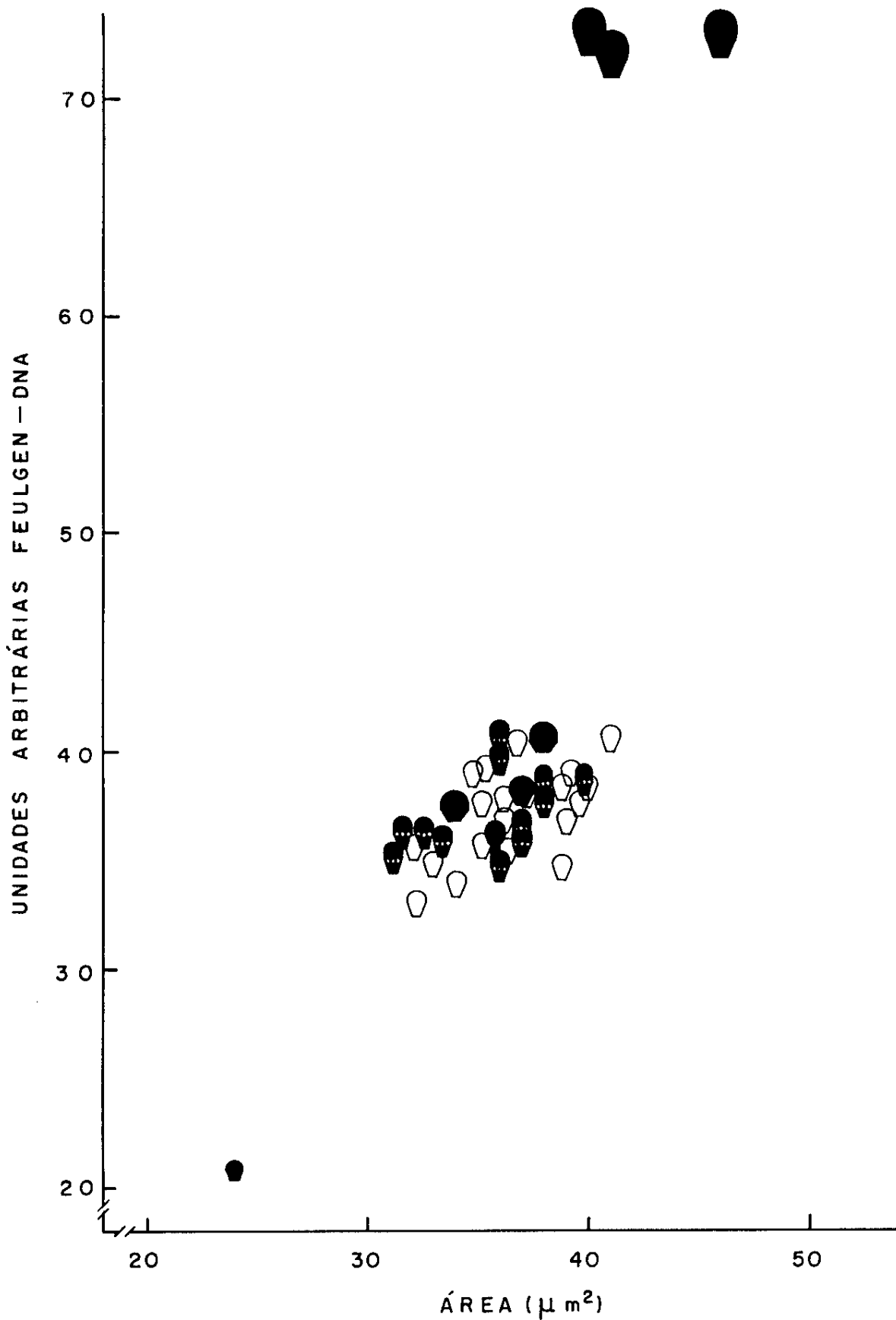


Gráfico 6 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 6 (Bos taurus)

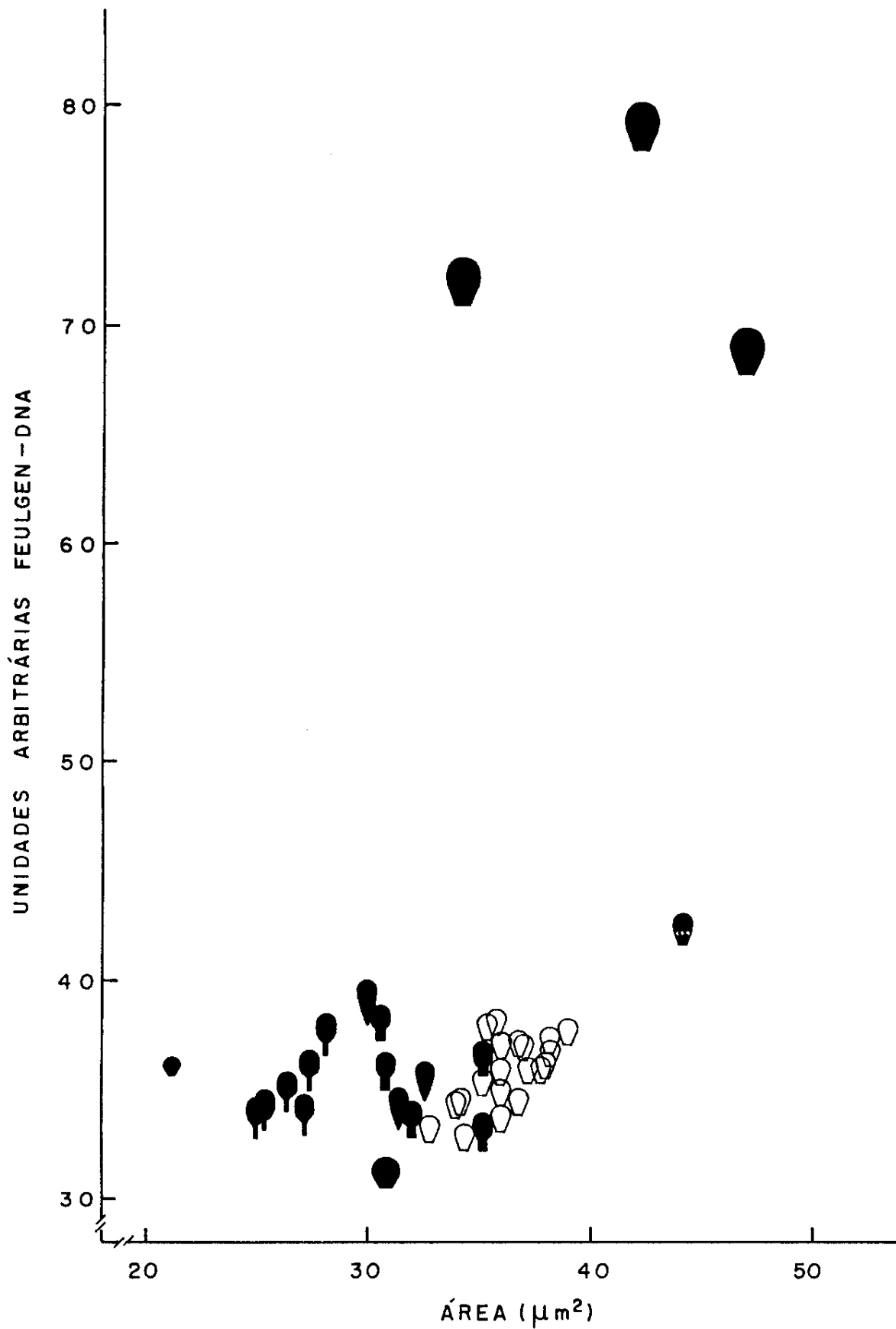


Gráfico 7 - Correlação dos valores Feulgen-DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 7 ( Bos taurus )

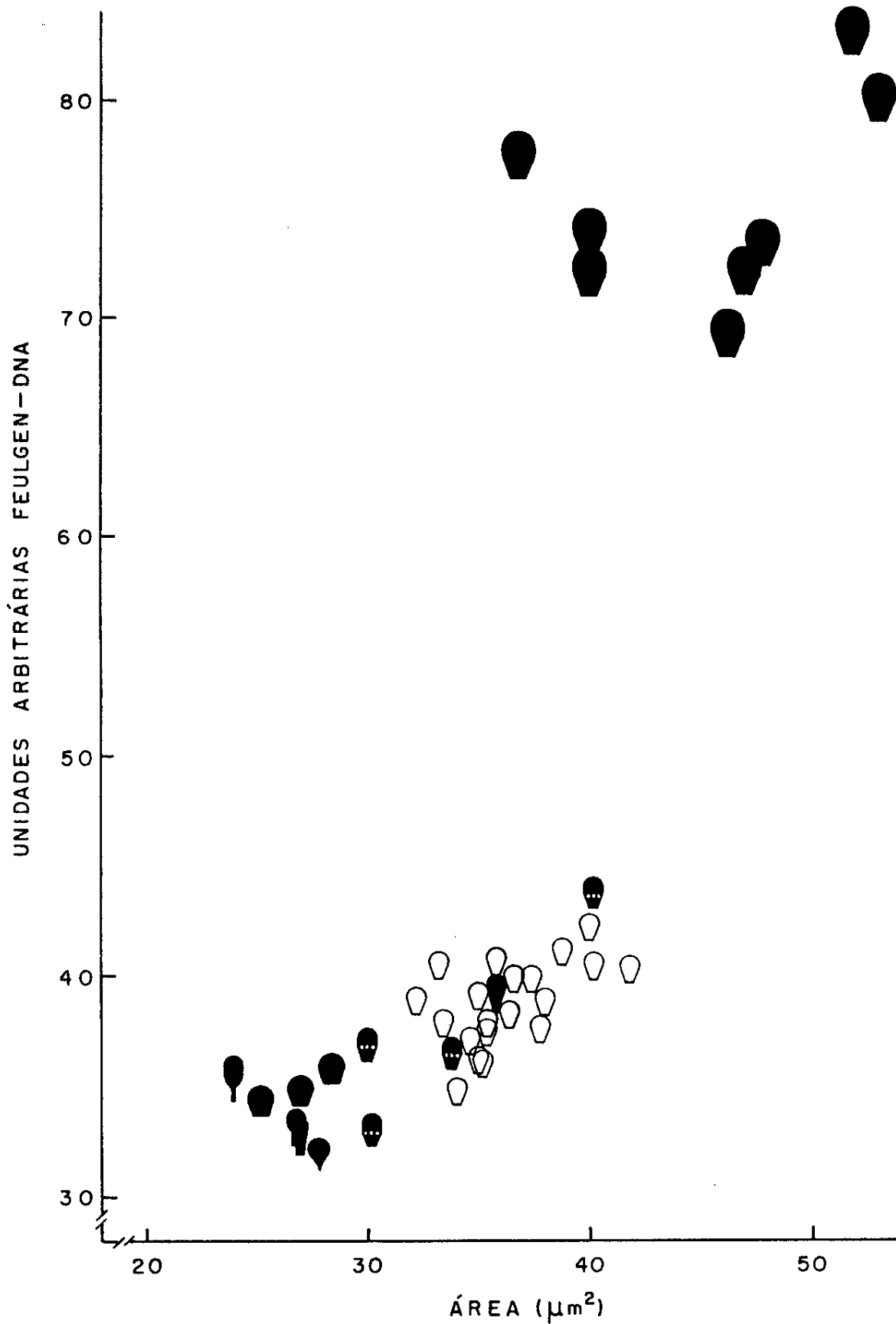




Gráfico 8 Correlação dos valores Feulgen- DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 8 (Bos taurus)

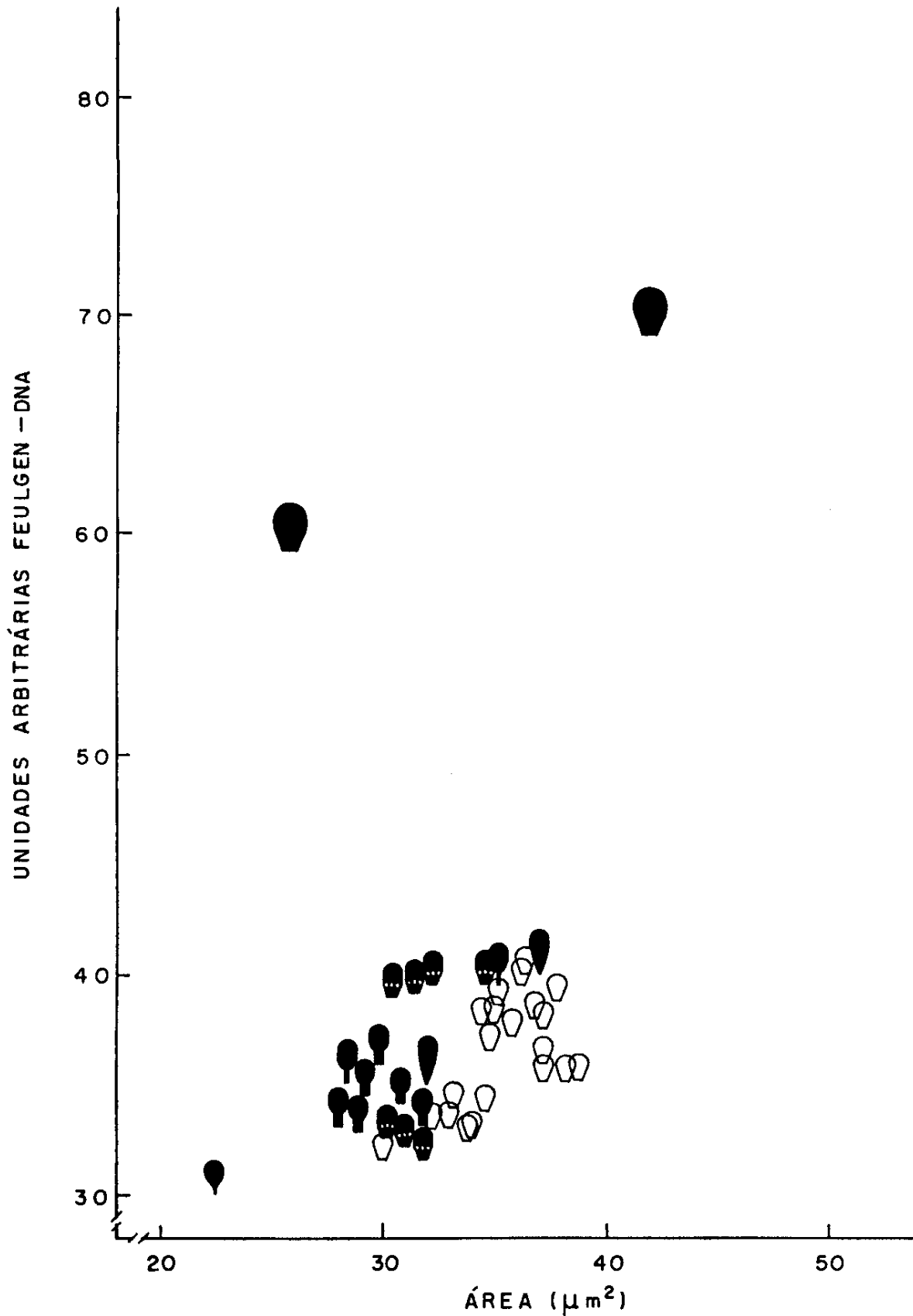
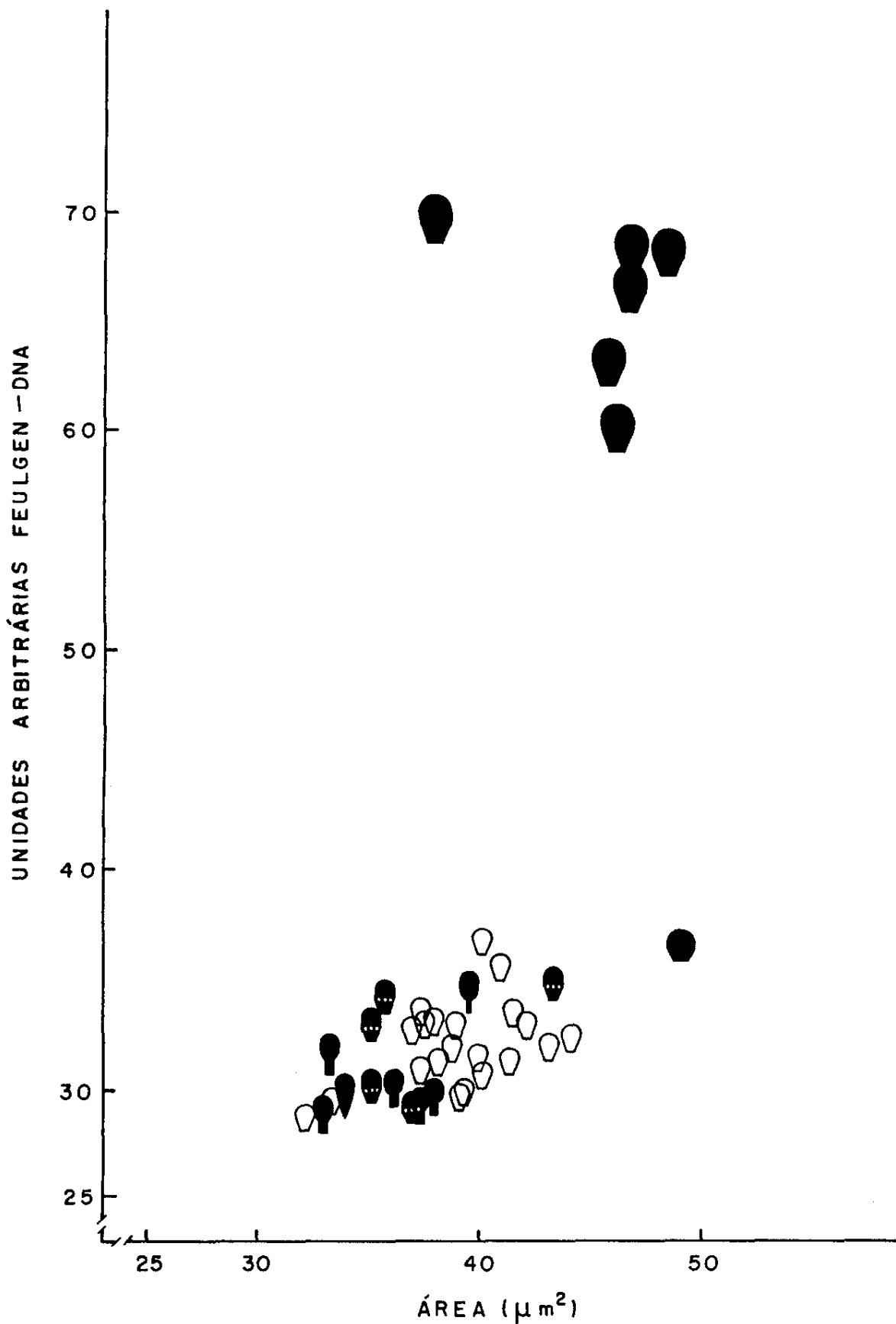




Gráfico 10 Correlação dos valores Feulgen-DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 10 (Bos indicus)



#### 4.2.1.2 - COMPARAÇÃO DENTRO DAS ESPÉCIES

##### *Bos taurus e Bos indicus*

As Tabelas 19 e 21 demonstram que a variação em valores Feulgen-DNA para núcleos normais continua sendo significativa, mesmo separando os valores segundo as duas diferentes espécies. Da mesma forma que aconteceu para os valores Feulgen-DNA, a variação significativa que existia entre os valores de área dos núcleos normais em conjunto, também se manifestou quando foram considerados em separado os dados dos animais das duas espécies (Tabelas 23 e 25).

No caso dos núcleos anômalos, os resultados indicam que a variação nos valores Feulgen-DNA, quando agrupados os animais das duas espécies, pode ser devida a uma variação individual contribuída pelos espécimes de *Bos taurus* (Tabela 20) ou ao processo de escolha das células, embora tenha se procurado analisar as anomalias encontradas ao acaso. Considerando-se os valores de área dos núcleos anômalos, não foi demonstrada diferença significativa tanto para *Bos taurus* como para *Bos indicus* (Tabelas 24 e 26).

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA  
PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE  
TOUROS *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	189,50	47,38	13,09
Resíduo	95	343,94	3,62	
TOTAL	99	533,44		

F(0,01) crítico = 3,53; F(0,005) = 4,01

\*\* Altamente significativa

TABELA 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA  
PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE  
TOUROS *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	3585,0	896,25	3,74*
Resíduo	95	22741,0	239,38	
TOTAL	99	26326,0		

F(0,01) crítico = 3,53

\*Significante

TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA  
PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE  
TOUROS *Bos indicus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	451,5	112,9	5,72*
Resíduo	95	1875,9	19,7	
TOTAL	99	2327,5		

F(0,01) crítico = 3,53

\*Significante

TABELA 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos indicus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	3575,0	893,75	2,91*
Resíduo	95	29168,0	307,03	
TOTAL	99	32744,0		

F(0,01) crítico = 3,53

\*Não significativa

TABELA 23 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	125,17	31,29	5,38*
Resíduo	95	552,07	5,81	
TOTAL	99	677,24		

F(0,01) crítico = 3,53

\*Significante

TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	448,9	112,2	2,12
Resíduo	95	5031,4	53,0	
TOTAL	99	5480,3		

F(0,01) crítico = 3,53

Não significativa

TABELA 25 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS *Bos indicus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	101,25	25,31	5,30*
Resíduo	95	453,92	4,78	
TOTAL	99	555,17		

F(0,01) crítico = 3,53

\*Significante

TABELA 26 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS *Bos indicus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	711,5	177,9	2,87*
Resíduo	95	5882,6	61,9	
TOTAL	99	6594,1		

F(0,01) crítico = 3,53.

\*Não significativa

#### 4.2.1.3 - COMPARAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES:

*Bos indicus* X *Bos taurus*

Os valores Feulgen-DNA médios bem como os respectivos intervalos de confiança ao nível de 95% obtidos para o conjunto de núcleos, morfologicamente normais e anômalos, foram reunidos por espécie (Tabelas 27 e 28 e Esquemas 7 e 8). A análise de variância aplicada a esses valores totais (Tabelas 29 e 30) demonstrou não existir a esse nível diferença estatisticamente significativa entre as espécies. Também os valores de área foram igualmente agrupados e analisados (Tabelas 31 a 34; Esquemas 9 e 10). A análise de variância indicou que a diferença entre os valores de área, tanto para núcleos normais como para núcleos anômalos, entre as espécies comparadas (Tabelas 33 e 34) é estatisticamente significativa. Possivelmente contribua para tal, pelo menos no caso dos núcleos de morfologia normal, uma variação em seu tamanho conforme a espécie considerada, e detectável mesmo visualmente, sem que isso afete o seu padrão de forma.





TABELA 29 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos indicus* x *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	0,5	0,5	0,04
Resíduo	198	2860,9	14,4	
TOTAL	199	2861,4		

F(0,01) crítico = 6,76  
 Não significativa

TABELA 30 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos indicus* x *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	24,0	24,0	0,08
Resíduo	198	59070,0	298,0	
TOTAL	199	59094,0		

F(0,01) crítico = 6,76  
 Não significativa

TABELA 31 - ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR ( $\mu\text{m}^2$ ) DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE DAS ESPÉCIES *Bos indicus* e *Bos taurus*.

ESPÉCIE ANIMAL	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)	N
1. <i>Bos indicus</i>	37,82	$\pm$	2,37	6,27	100
2. <i>Bos taurus</i>	35,90	$\pm$	7,30	7,30	100

ESQUEMA 9 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 2,49.

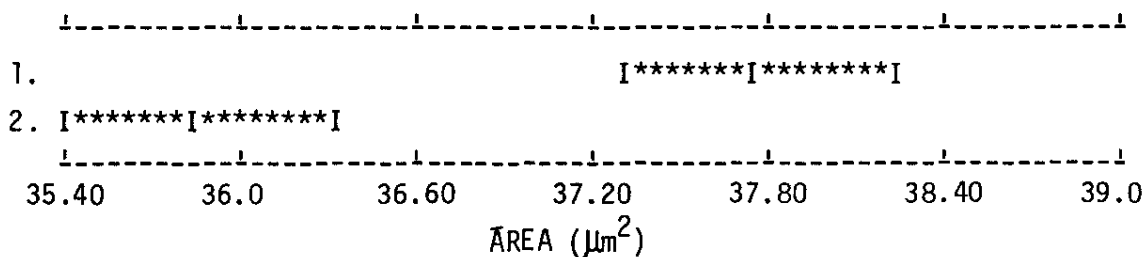


TABELA 32 - ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR ( $\mu\text{m}^2$ ) DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE DAS ESPÉCIES *Bos indicus* e *Bos taurus*.

ESPÉCIE ANIMAL	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)	N
1. <i>Bos indicus</i>	37,47	$\pm$	8,16	21,78	100
2. <i>Bos taurus</i>	33,09	$\pm$	7,44	22,48	100

ESQUEMA 10 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 7,81

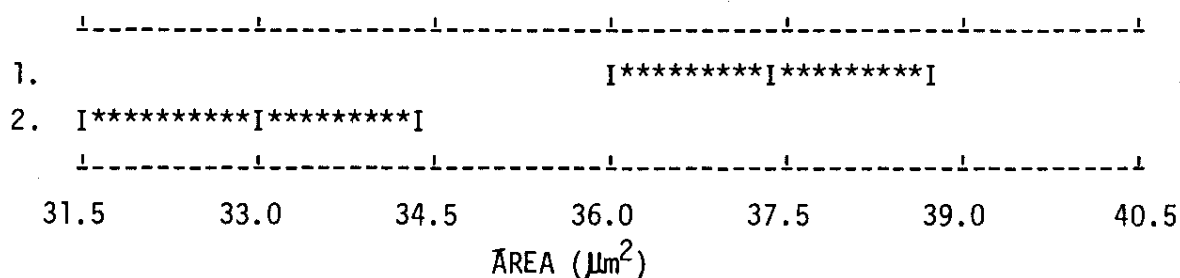


TABELA 33 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos indicus* x *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	184,57	184,57	29,67 **
Resíduo	198	1232,41	6,22	
TOTAL	199	1416,98		

F(0,01) crítico = 6,76; F(0,005) = 8,06

\*\*Altamente significante

TABELA 34 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS *Bos indicus* x *Bos taurus*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	963,6	936,6	15,80**
Resíduo	198	12074,3	61,0	
TOTAL	199	13037,9		

F(0,01) crítico = 6,76; f(0,005) crítico = 8,06

\*\*Altamente significante

#### 4.2.2 - GADO PÉ-DURO

##### 4.2.2.1 - COMPARAÇÃO GERAL ENTRE OS TOUROS

Os valores Feulgen-DNA médios obtidos para os núcleos morfológicamente normais e anômalos acham-se reunidos nas Tabelas 35 e 36. Da mesma forma, os intervalos de confiança para esses dados estão indicados nos Esquemas 11 e 12.

No caso dos núcleos normais, a variação nos valores Feulgen-DNA alcançou amplitude  $a=8,08$ . Dentre os animais analisados, os touros 8, 9 e 10 apresentaram valores médios mais baixos que os demais (Tabela 35). Os desvios padrões e coeficientes de variação confirmaram a dispersão existente entre os valores médios, contudo, em nenhum dos animais detectou-se uma dispersão nos dados tão elevada como a encontrada no touro 9 do rebanho de elite (Tabela 9). O coeficiente de variação não ultrapassou 10%, indicando, portanto, uma certa homogeneidade nos dados.

Já para os valores Feulgen-DNA médios de núcleos anômalos de cada touro, a variação foi mais elevada (Tabela 36), com amplitude  $a=20,9$ . Como o coeficiente de variação para a maioria dos animais considerados ultrapassou 30%, existe uma grande heterogeneidade entre os dados, o que era de se esperar, dado os diferentes tipos de anomalias agrupadas, da mesma forma que ocorreu para o caso dos animais de rebanho de elite. Com base em análise de variância (Tabelas 37



TABELA 36 - VALORES FEULGEN-DNA EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO.

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO LÂMINAS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)	N
Pê-duro	1	33,3	$\pm$	8,4	25,23	20
Pê-duro	2	39,8	$\pm$	14,9	37,44	20
Pê-duro	3	33,6	$\pm$	8,4	25,00	20
Pê-duro	4	54,2	$\pm$	20,3	37,45	20
Pê-duro	5	42,1	$\pm$	16,8	39,90	20
Pê-duro	6	38,0	$\pm$	2,7	7,11	6
Pê-duro	7	49,7	$\pm$	18,8	37,83	20
Pê-duro	8	40,0	$\pm$	15,0	37,50	12
Pê-duro	9	33,9	$\pm$	9,6	28,32	14
Mestiço	10	38,6	$\pm$	14,2	36,79	20

ESQUEMA 12 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 14,56

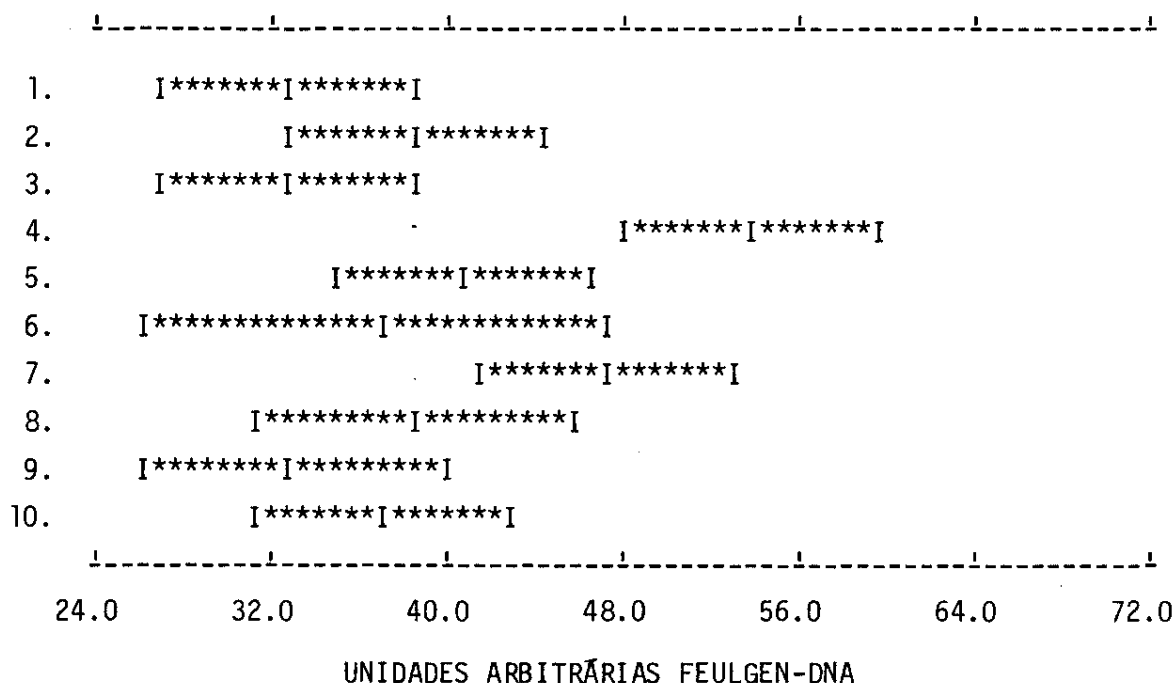


TABELA 37 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES FEULGEN-DNA DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	1200,50	133,39	35,55**
Resíduo	190	712,94	3,75	
TOTAL	199	1913,44		

F(0,01) crítico = 2,50 ; F(0,005) = 2,74  
 \*\*Altamente significante

TABELA 38 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES FEULGEN-DNA DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	8210,0	912,22	4,30*
Resíduo	162	34339,0	211,97	
TOTAL	171	42549,0		

F(0,01) crítico = 2,52  
 \*Significante

Com respeito aos valores médios de área nuclear para os espermatozoides morfológicamente normais, houve uma variação nestes valores com amplitude  $a=9,75$ . Com base nos dados da Tabela 39 observa-se que o touro 6 apresenta núcleos com área maior que a dos demais, enquanto o inverso ocorre com o touro 8. O coeficiente de variação máximo foi 10,37% portanto, pode se dizer que existe razoável homogeneidade nos valores, apesar das diferenças observadas. O Esquema 13 apresenta os intervalos de confiança para os dados da Tabela 39. Neste esquema salienta-se a posição relativa dos valores dos touros 6 e 8 comparada à dos demais.

Para o caso dos valores médios de área dos núcleos anômalos a variação foi maior do que a encontrada em núcleos normais, semelhante ao que se verificou para os valores Feulgen-DNA, o que pode ser constatado pela amplitude  $a=10$ . Da mesma forma que ocorreu para os valores Feulgen-DNA, os touros 6 e 8 apresentaram valores de área nuclear mais altos (Touro 6) e mais baixos (Touro 8) (Tabela 40; Esquema 14). Os desvios padrões e coeficientes de variação também foram mais elevados do que para os núcleos normais. O coeficiente de variação variou de 11,88 a 47,98% em toda a amostra, o que indica uma grande heterogeneidade entre os dados (Tabela 40).

A comparação de todos os valores de área nuclear através de análise de variância indica diferença estatisticamente significativa apenas para os núcleos normais (Tabelas 41 e 42).



TABELA 39 - ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR ( $\mu\text{m}^2$ ) DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN (N = nº de medidas = 20).

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO LÂMINAS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V. (%)
Pê-duro	1	39,70	$\pm$	2,59	6,52
Pê-duro	2	39,66	$\pm$	3,97	10,01
Pê-duro	3	37,70	$\pm$	3,91	10,37
Pê-duro	4	36,84	$\pm$	3,31	8,98
Pê-duro	5	38,16	$\pm$	3,74	9,80
Pê-duro	6	45,78	$\pm$	3,87	8,45
Pê-duro	7	36,46	$\pm$	1,96	5,38
Pê-duro	8	29,91	$\pm$	2,86	9,56
Pê-duro	9	34,76	$\pm$	2,53	7,28
Mestiço	10	38,10	$\pm$	2,20	5,77

ESQUEMA 13 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 3,18.

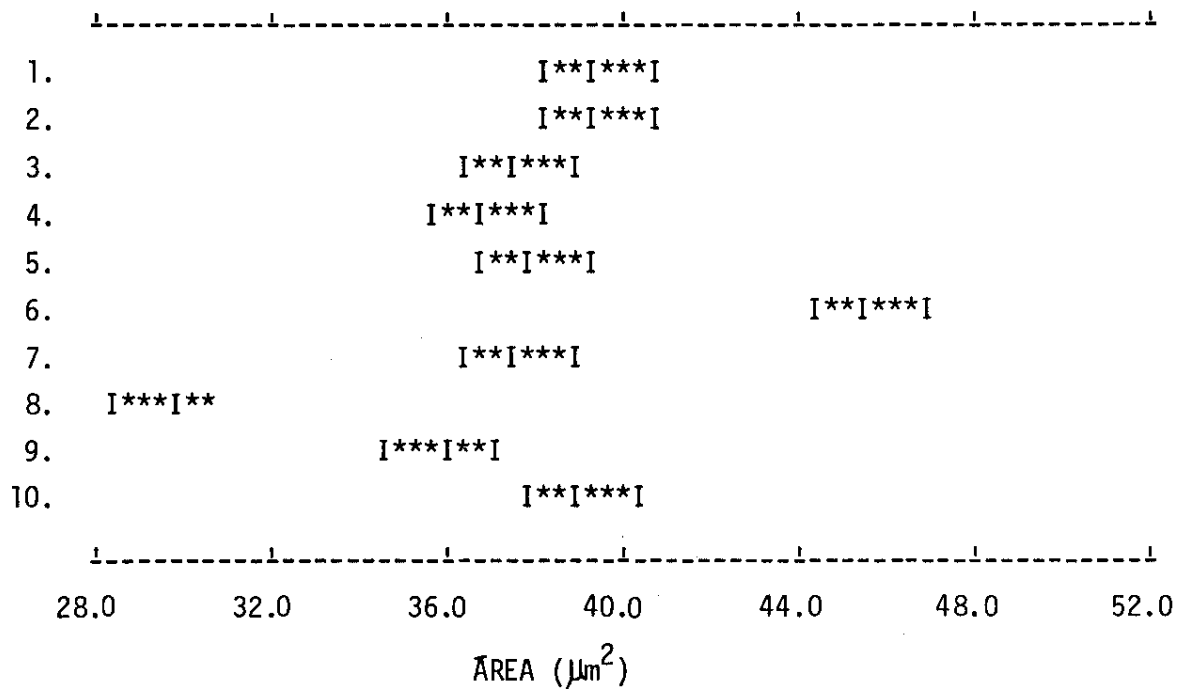


TABELA 40 - ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR ( $\mu\text{m}^2$ ) DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEM.

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO LÂMINAS	X	±	S	C.V.(%)	N
Pê-duro	1	33,0	+	4,8	14,55	20
Pê-duro	2	34,0	+	7,1	20,88	20
Pê-duro	3	30,8	+	4,2	13,64	20
Pê-duro	4	37,5	+	10,2	27,2	20
Pê-duro	5	39,7	+	17,5	44,08	20
Pê-duro	6	42,1	+	5,0	11,88	20
Pê-duro	7	35,7	+	10,0	28,01	20
Pê-duro	8	32,1	+	7,4	23,05	12
Pê-duro	9	37,1	+	17,8	47,98	14
Mestiço	10	38,2	±	7,0	18,32	20

ESQUEMA 14 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDO COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 10,28.

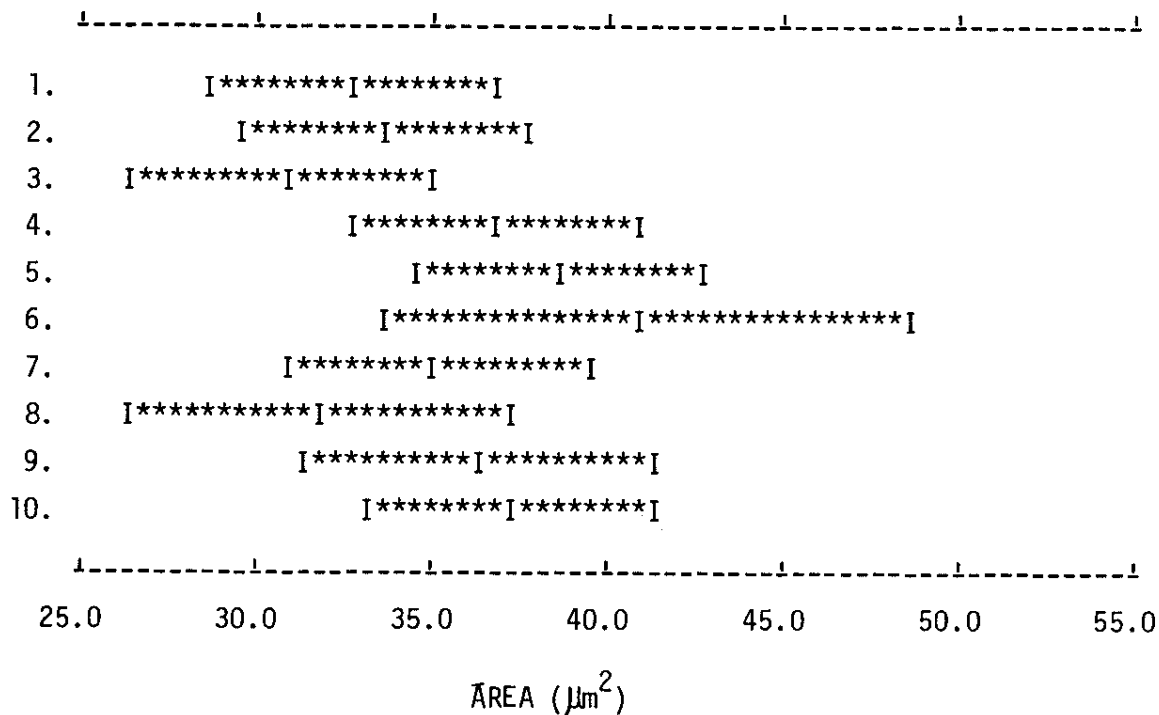


TABELA 41 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE ÁREA NUCLEAR DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	2899,6	322,2	31,93**
Resíduo	190	1916,9	10,1	
TOTAL	199	4816,5		

F(0,01) crítico = 2,50; F(0.005) crítico = 2,74  
 \*\*Altamente significativa

TABELA 42 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE ÁREA NUCLEAR DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	9	1621,0	180,1	1,70
Resíduo	162	17147,0	105,8	
TOTAL	171	18768,0		

F(0,01) crítico = 2,52  
 Não significativa

Os valores Feulgen-DNA e de área nuclear foram também comparados entre os touros da raça Pê-duro, excluindo-se o touro mestiço (Tabelas 43 a 46).

Os resultados mostraram-se equivalentes àqueles obtidos para os touros da raça Pê-duro sem exclusão do mestiço, tanto para os valores Feulgen-DNA (Tabelas 43 e 44) como para os valores de área (Tabelas 45 e 46). Igualmente, não houve diferença significativa para os valores de área nuclear de núcleos anômalos (Tabela 46).

TABELA 43 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO, EXCLUINDO-SE O TOURO MESTIÇO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	910,67	113,83	29,32**
Resíduo	171	663,80	3,88	
TOTAL	179	1574,47		

F(0,01) crítico = 2,61; F(0,005) crítico = 2,88

\*\*Altamente significativa

TABELA 44 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO, EXCLUINDO-SE O TOURO MESTIÇO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	8107,0	1013,38	4,75*
Resíduo	143	30512,0	213,37	
TOTAL	151	38619,0		

F(0,01) crítico = 2,64

\*Significante

TABELA 45 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS NORMAIS DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO, EXCLUINDO-SE O TOURO MESTIÇO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	2896,2	362,0	33,93**
Resíduo	171	1824,7	10,7	
TOTAL	179	4720,9		

F(0,01) crítico = 2,61; F(0,005) = 2,88

\*\*Altamente significativa

TABELA 46 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE ÁREA NUCLEAR PARA NÚCLEOS ANÔMALOS DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO, EXCLUINDO-SE O TOURO MESTIÇO.

FONTE DE VARIACÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	1479,0	184,88	1,63
Resíduo	143	16220,0	113,43	
TOTAL	151	17699,0		

F(0,01) crítico = 2,64  
 Não significante

Os valores Feulgen-DNA X área absorvente nuclear de núcleos morfológicamente normais e anômalos foram também estudados com o método de correlação de Pearson.

Os resultados, no caso dos núcleos normais demonstraram que individualmente, os touros 2,3,5,6 e 9 possuem seus valores fortemente correlacionados ao nível de 1%, enquanto para os demais touros, os valores apresentam no máximo 17,4% de correlação (Touro 10) (Tabela 47). Apesar disso, a correlação entre todos os valores é significativa (Tabela 47).

Quanto aos núcleos anômalos, para os touros 1,3, 6, 8, e 9 não existe correlação significativa (Tabela 48). Neste caso, os valores estão fracamente correlacionados e apresentam no máximo 37,21% de correlação (Touro 6). Para o touro 1 a correlação é de apenas 0,49%. Contudo, a correlação total foi significativa a 1% (Tabela 48).

TABELA 47 - CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS VALORES FEULGEN-DNA X ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS DA RAÇA PE-DURO.

HIPÓTESES	TOUROS	COEFICIENTE	GL	SIGNIFICÂNCIA	DECISÃO
$H_0: \rho=0$	1	0.328	18	NS	Aceita-se $H_0$
$H_1: \rho \neq 0$	2	0.816	18	SS	Aceita-se $H_1$
	3	0.712	18	SS	Aceita-se $H_1$
	4	0.393	18	NS	Aceita-se $H_0$
	5	0.810	18	SS	Aceita-se $H_1$
	6	0.597	18	SS	Aceita-se $H_1$
	7	0.139	18	NS	Aceita-se $H_0$
	8	0.325	18	NS	Aceita-se $H_0$
	9	0.589	18	SS	Aceita-se $H_1$
	10	0.414	18	NS	Aceita-se $H_0$
CORRELAÇÃO TOTAL		0.648	198	SS	Rejeita-se $H_0$ Aceita-se $H_1$

OBS.: SS = Significante a  $P 0,01$        $r(0,01)$  crítico      18 = 0,561  
 NS = Não significante                      para os GL:                      198 = 0,254

TABELA 48 - CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS VALORES FEULGEN-DNA X ÁREA ABSORVENTE NUCLEAR DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PE-DURO.

HIPÓTESES	TOUROS	COEFICIENTE	GL	SIGNIFICÂNCIA	DECISÃO
$H_0: P=0$	1	0.070	18	NS	Aceita-se $H_0$
$H_1: P \neq 0$	2	0.921	18	SS	Aceita-se $H_1$
	3	0.411	18	NS	Aceita-se $H_0$
	4	0.859	18	SS	Aceita-se $H_1$
	5	0.716	18	SS	Aceita-se $H_1$
	6	0.610	4	NS	Aceita-se $H_0$
	7	0.821	18	SS	Aceita-se $H_1$
	8	0.513	10	NS	Aceita-se $H_0$
	9	0.247	12	NS	Aceita-se $H_0$
	10	0.733	18	SS	Aceita-se $H_1$
CORRELAÇÃO TOTAL		0.583	170	SS	Rejeita-se $H_0$ Aceita-se $H_1$

OBS.: SS = Significante a P 0.01  
 NS = Não significativa  
 $r(0,01)$  crítico para os GL:  
 18 = 0,561  
 4 = 0,917  
 10 = 0,708  
 12 = 0,661  
 170 = 0,264

A correlação entre os valores Feulgen-DNA e área nuclear pode ser também avaliada através dos gráficos 11 a 20. A população nuclear normal também se distribuiu de forma semelhante à observada para os touros de rebanho de elite, com exceção da referente aos touros 8,9 e 10. Neste caso os valores Feulgen-DNA se apresentaram mais baixos que os demais.

Com respeito aos núcleos anômalos, a distribuição foi muito variada, estando geralmente relacionada com o tipo de patologia de cabeça apresentado. Como no caso dos touros de rebanho de elite, os núcleos poliplóides apresentaram o padrão esperado de diploidia, embora alguns deles possam indicar alguma aneuploidia (Gráficos 12,15 e 20, referentes aos touros 2,5 e 10, respectivamente). Ainda com respeito a estes núcleos, os touros 4 (Gráfico 14) e 5 (Gráfico 15) apresentaram valores de área mais elevados, ou seja, superior ao padrão geral que foi no máximo  $60 \mu\text{m}^2$ , no caso,  $75$  e  $98 \mu\text{m}^2$  respectivamente. Com respeito aos microespermatozóides, a sua distribuição não diferiu significativamente daquela dos animais de rebanho de elite. Ainda com relação aos núcleos pequenos, no touro 1 (Gráfico 11) foi detectado um núcleo com morfologia nuclear diferente (forma curta), cujo valor Feulgen-DNA em torno de 65 unidades arbitrárias foi elevadíssimo, no caso, semelhante ao de núcleos poliplóides. Provavelmente, se trata de um núcleo com cromatina extremamente compactada, pois a área nuclear não chegou a  $30 \mu\text{m}^2$  (Gráfico 11). Para o touro 9 (Gráfico 15) também foi detectado um núcleo anômalo (forma larga)



que apresentou área nuclear bastante elevada ( $96 \mu\text{m}^2$ ), no caso, uma área correspondente a de núcleos poliplóides. Provavelmente, em oposição ao que foi detectado no touro 1 (Gráfico 11) se trata de um núcleo que apresenta cromatina descompactada.

Gráfico 11 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 1 ( Pé - duro )

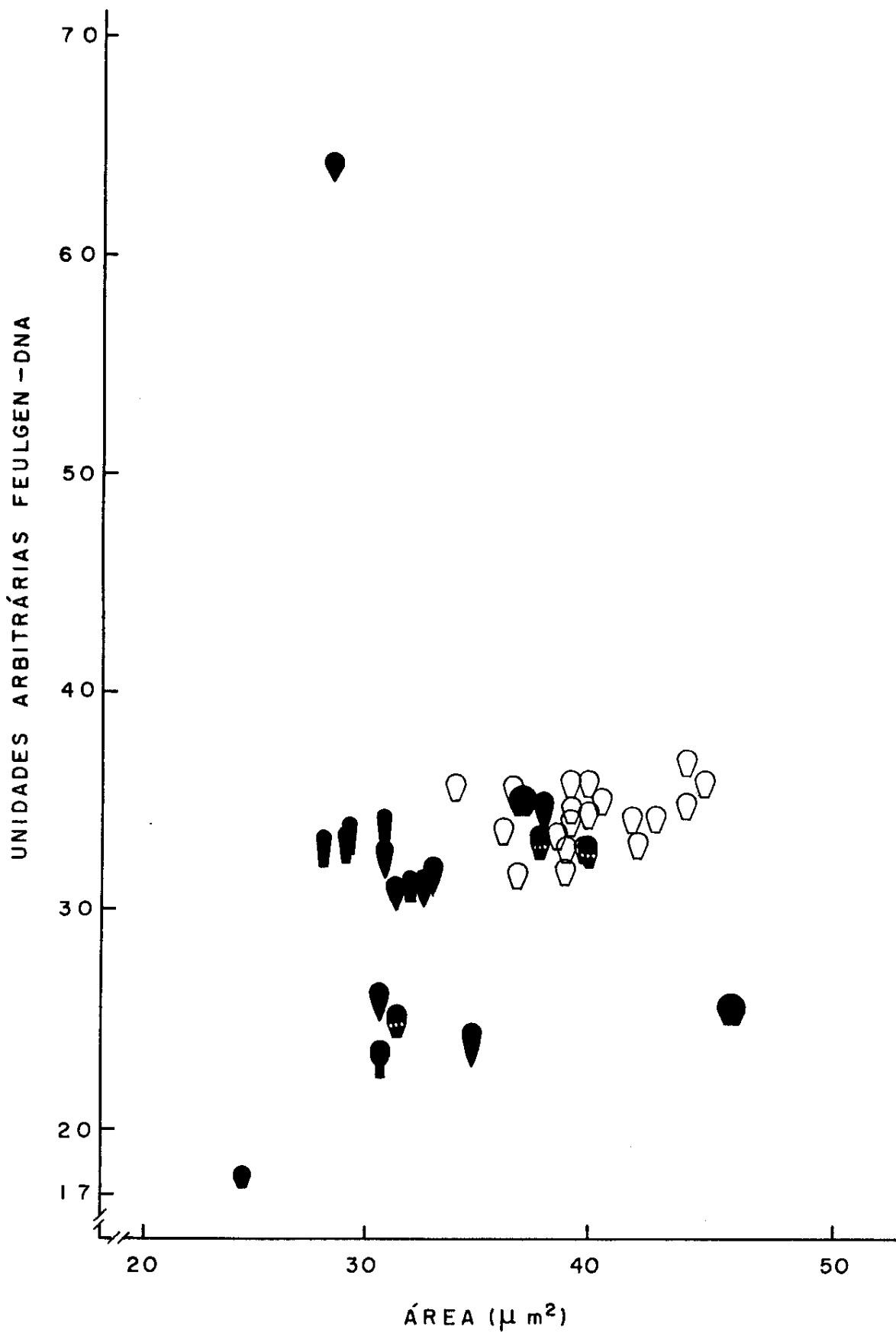


Gráfico 12 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 2 ( Pé-duro )

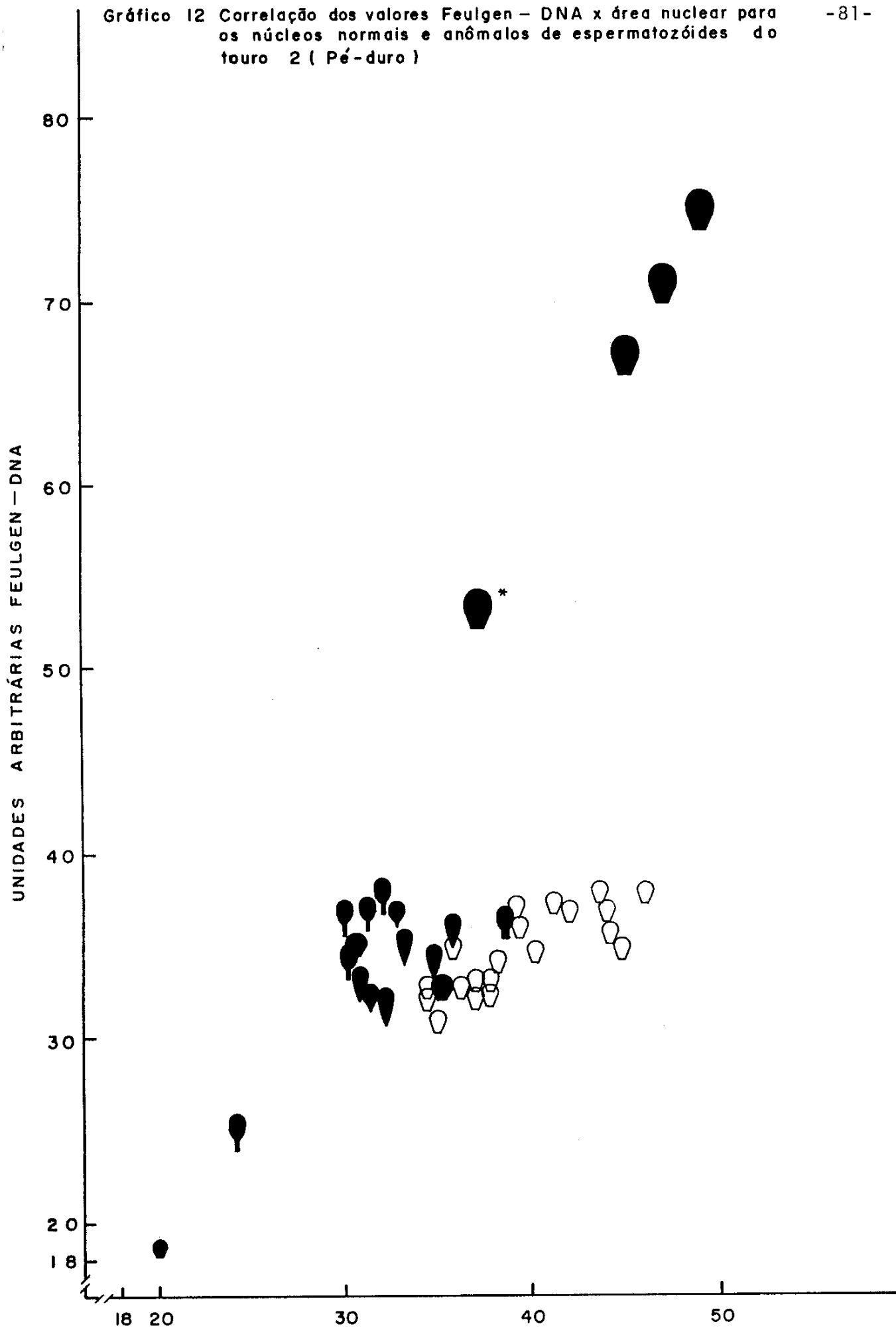


Gráfico 13 Correlação dos valores Feulgen-DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 3 (Pé-duro)

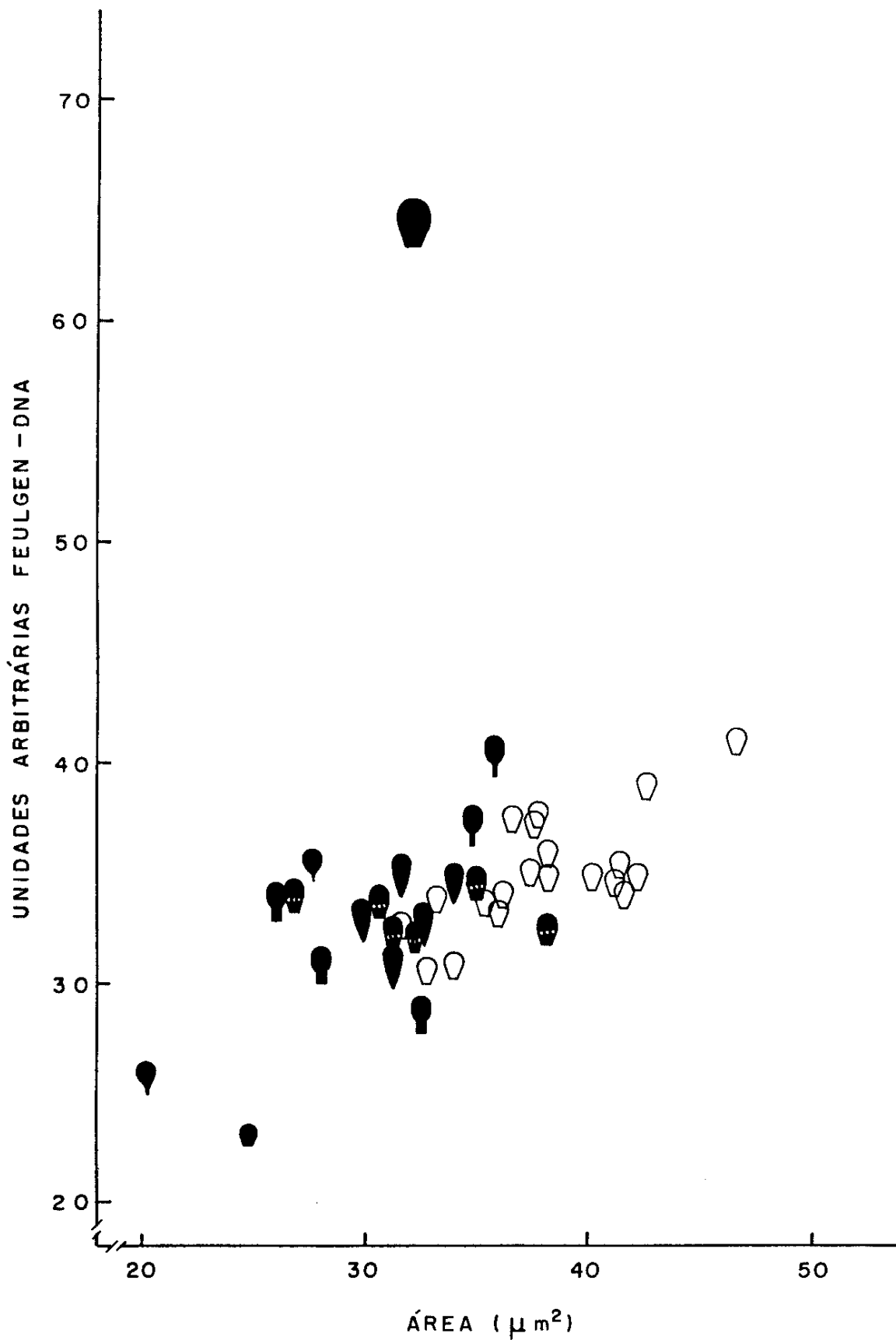


Gráfico 14 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 4 (Pé duro)

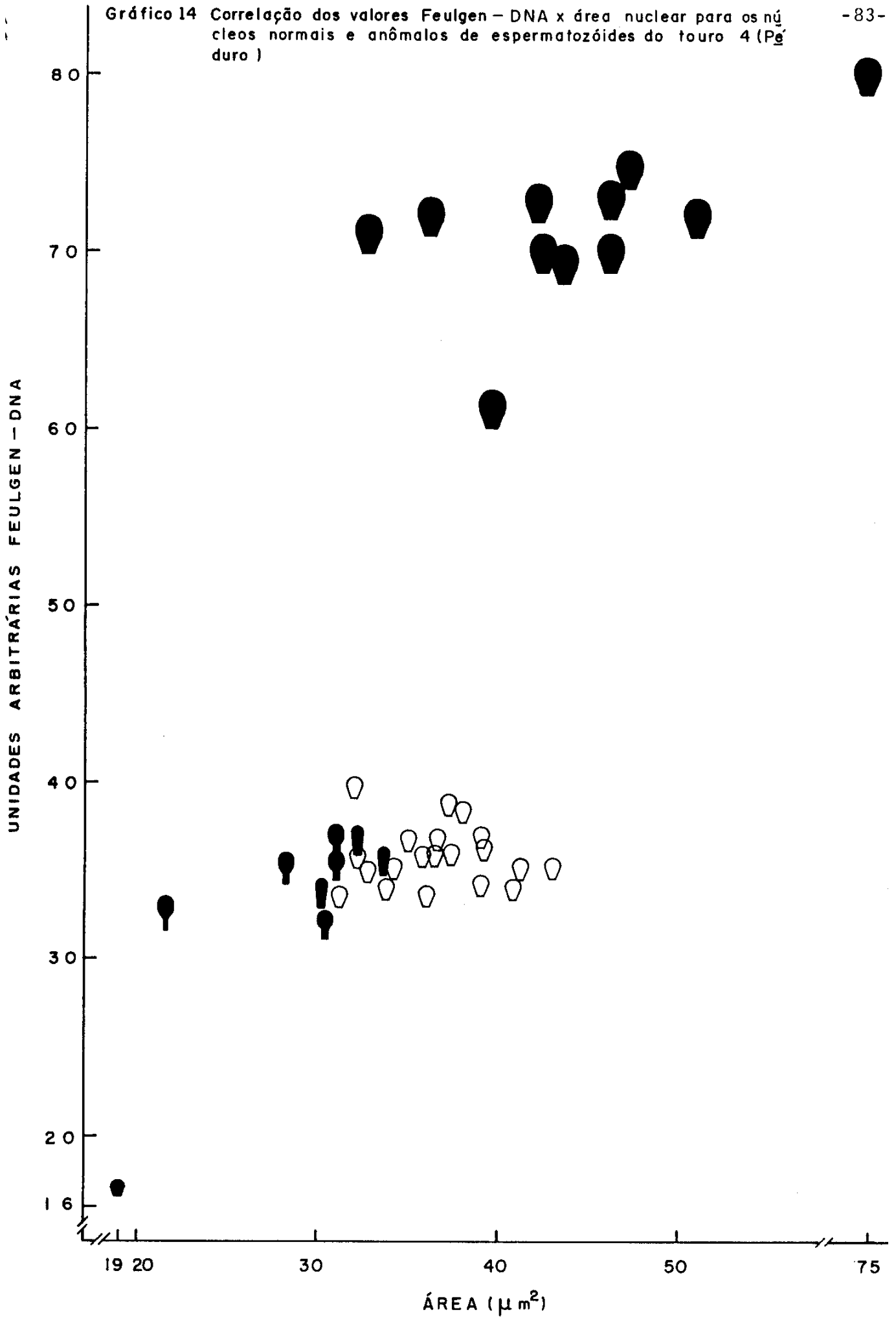


Gráfico 15 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 5 (Pé - duro)

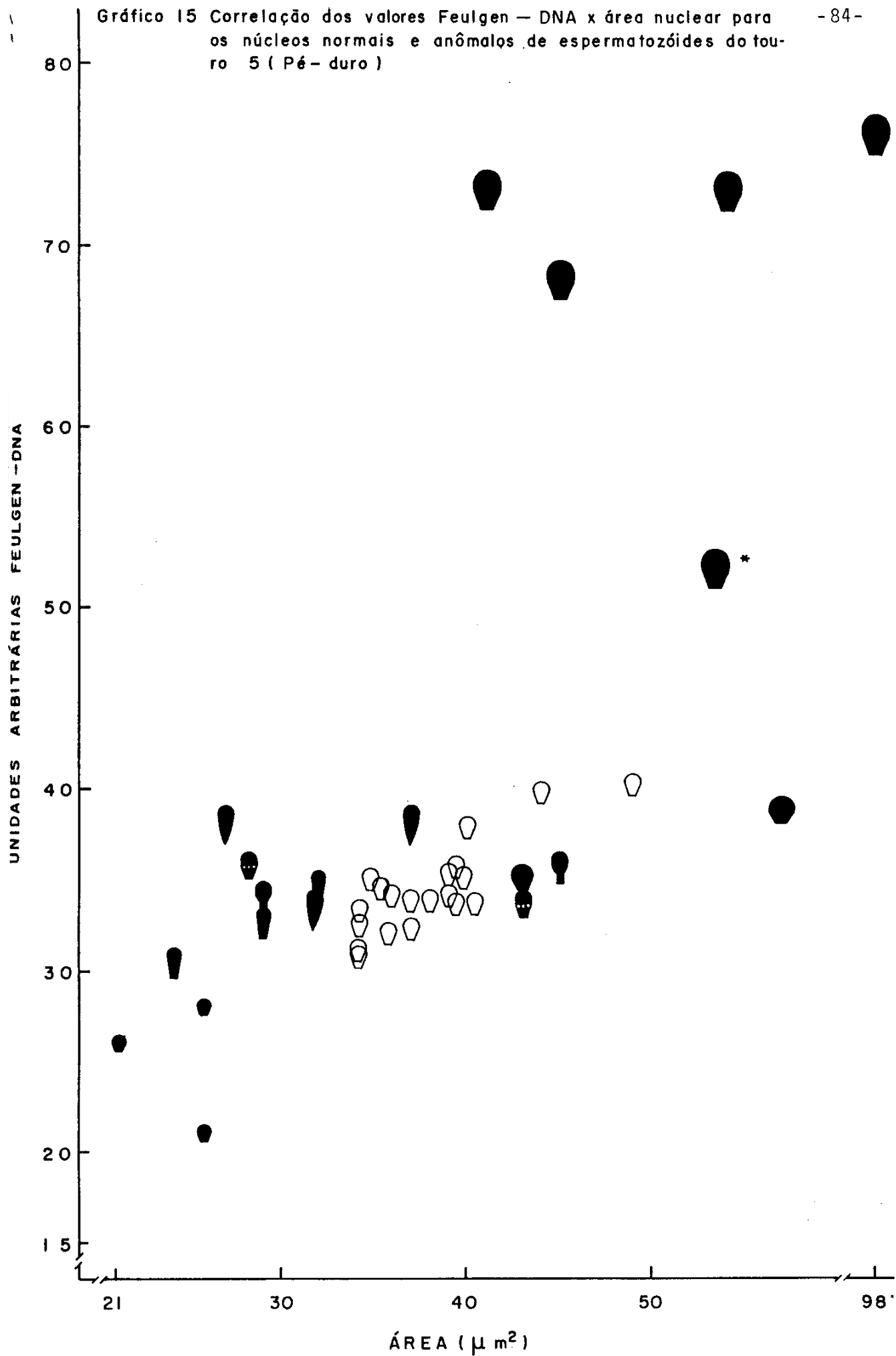


Gráfico 16 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 6 (Pé-duro)

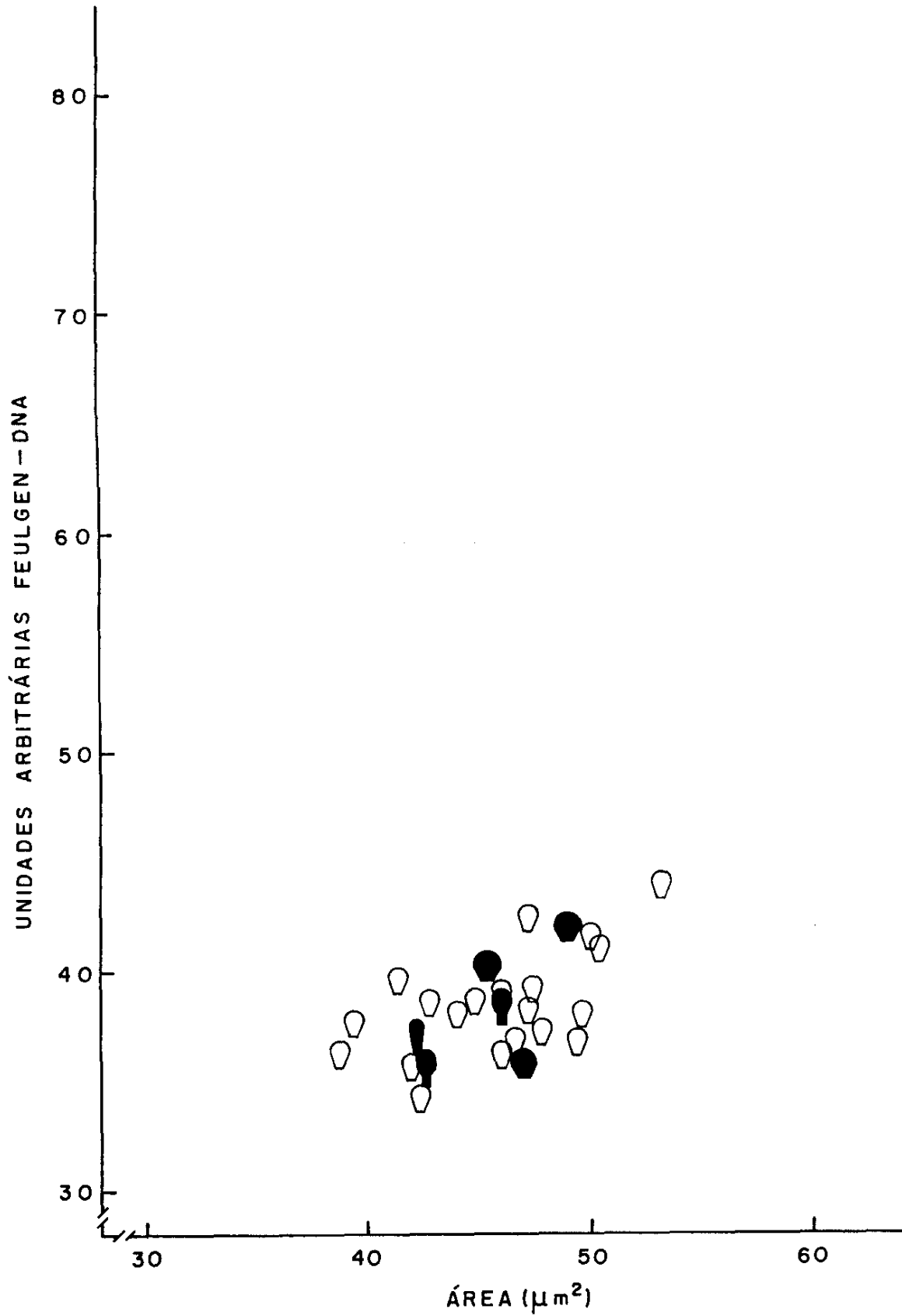


Gráfico 17 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozóides do touro 7 ( Pé-duro )

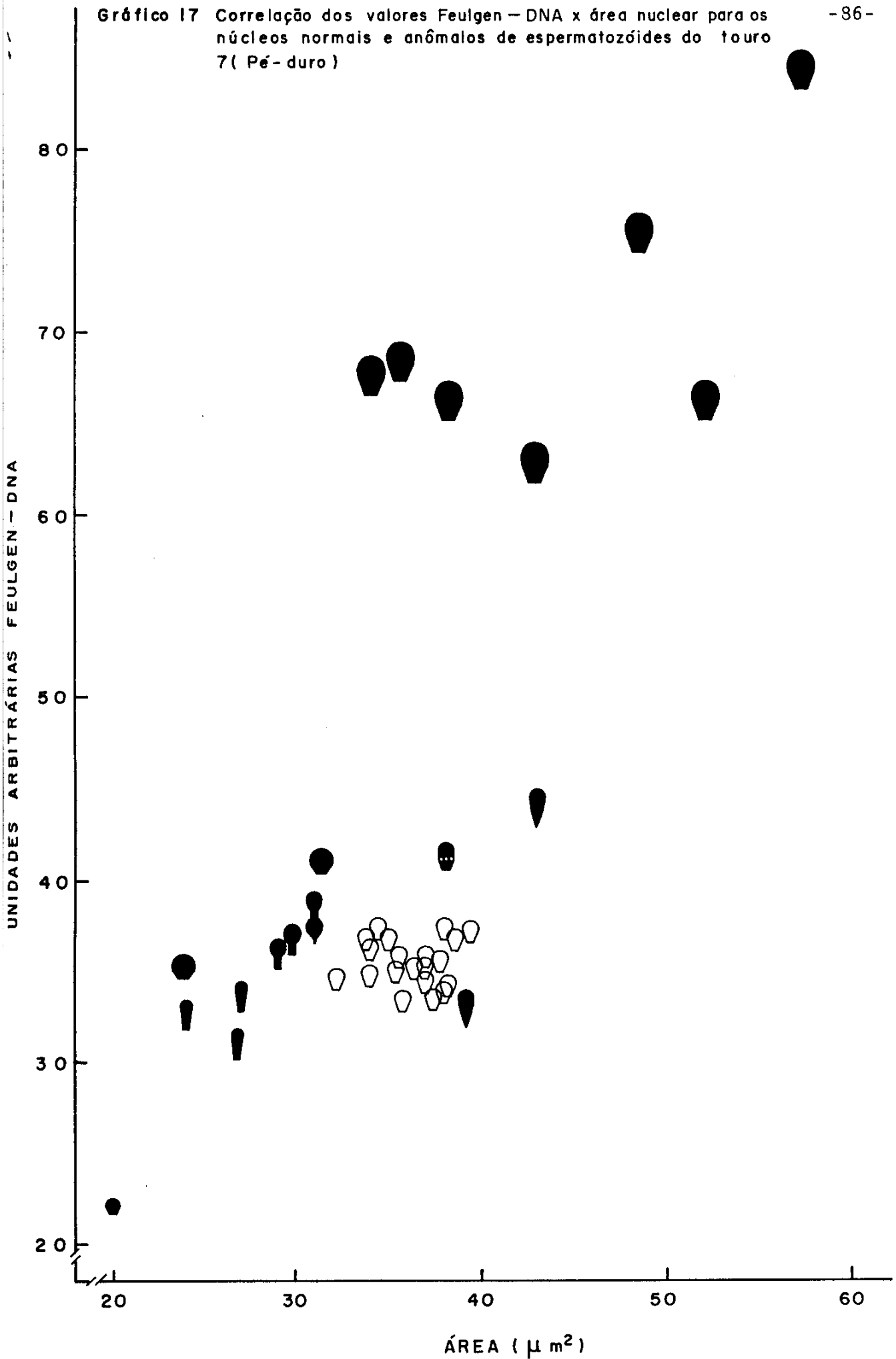




Gráfico 18 Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozoides do touro 8 (Pe' duro)

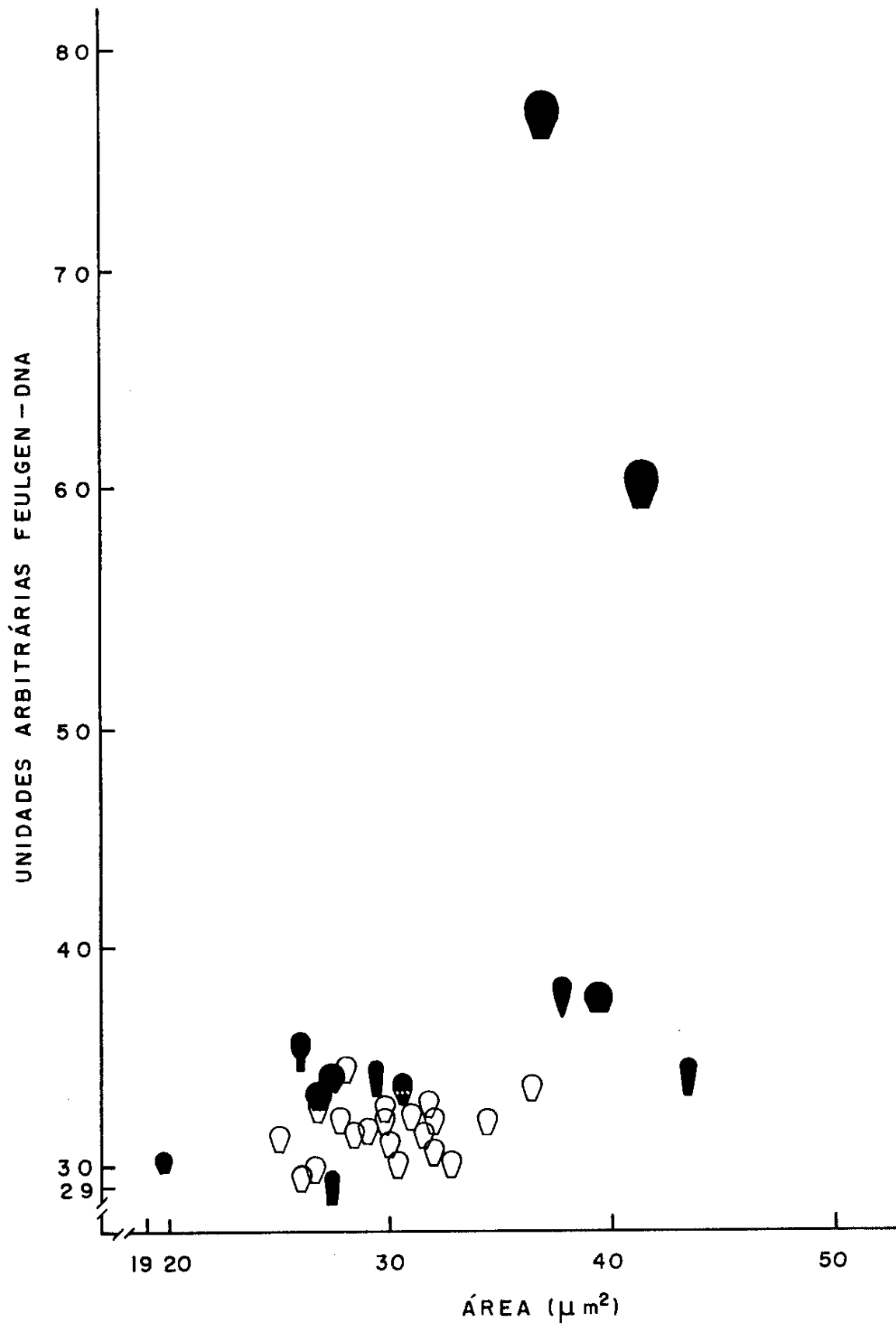


Gráfico 19 Correlação dos valores Feulgen-DNA x área nuclear para os núcleos -88- normais e anômalos de espermatozóides do touro 9 (Pé-duro)

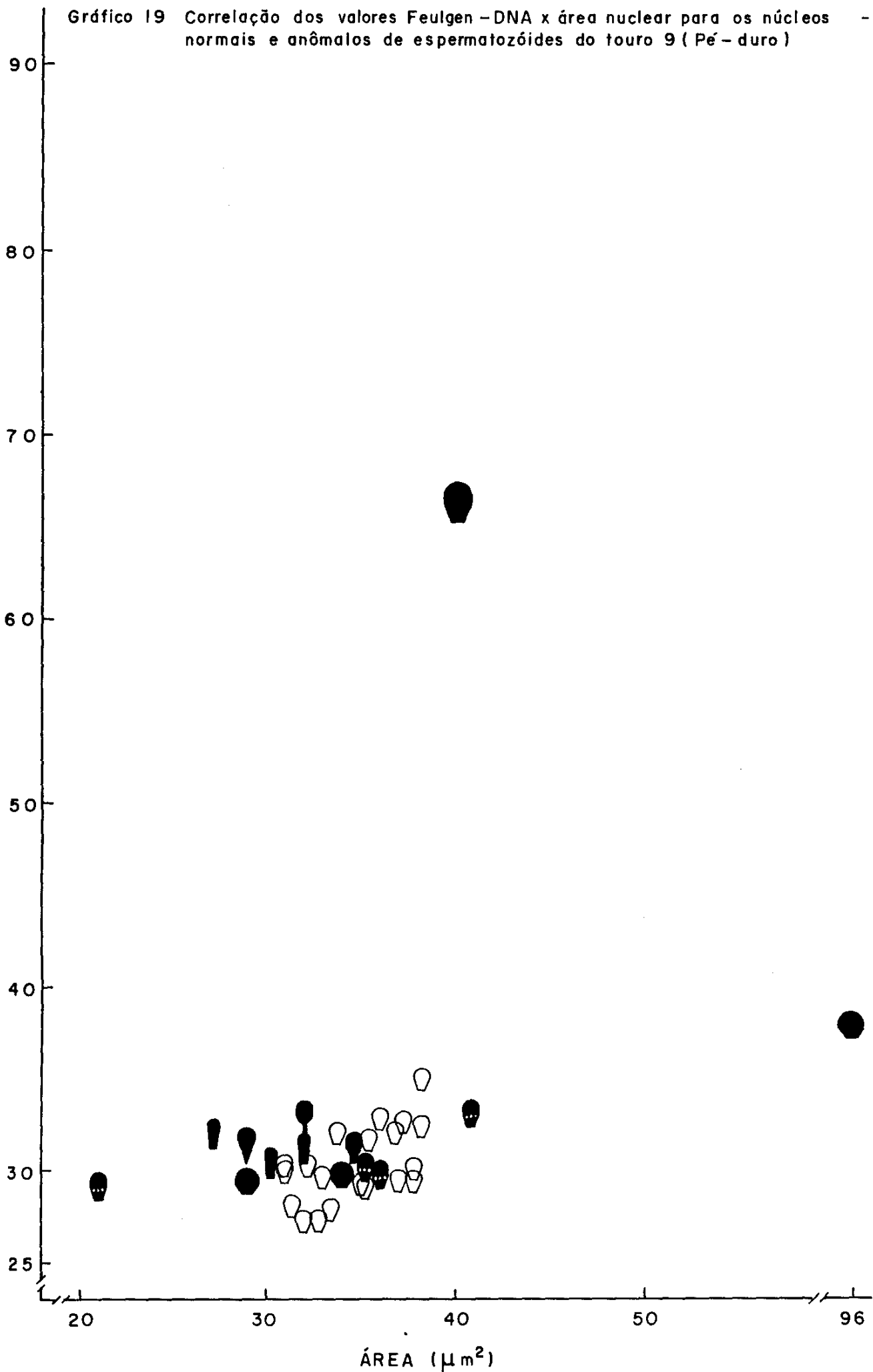
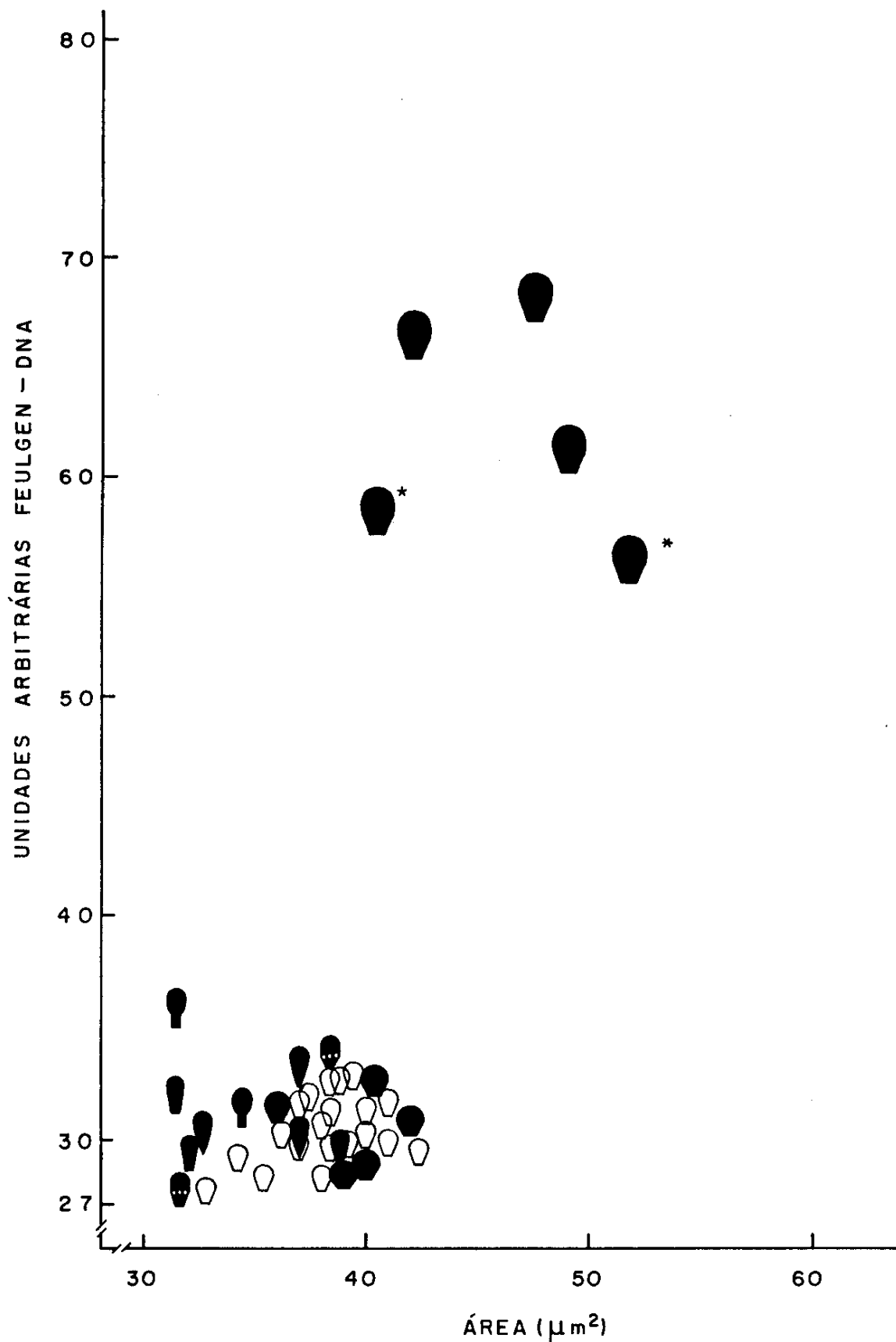


Gráfico 20 - Correlação dos valores Feulgen - DNA x área nuclear para os núcleos normais e anômalos de espermatozoides do touro 10 (mestiço)



#### 4.2.3 - COMPARAÇÃO PÊ-DURO X REBANHO DE ELITE

Os valores Feulgen-DNA como também os de área nuclear provenientes de núcleos morfológicamente normais e anômalos de touros de gado Pê-duro foram finalmente comparados aos de touros de rebanho de elite. Foram obtidos, tanto para a primeira, como para a segunda amostra, valores médios representativos de cada parâmetro, e intervalos de confiança a partir do total de medidas efetuadas para cada amostra (Tabelas 49 e 50; Esquemas 15 e 16). Os resultados da análise de variância demonstraram que, considerados em sua totalidade, os valores Feulgen-DNA de núcleos normais de espermatozoides de gado Pê-duro diferem de forma altamente significativa dos valores equivalentes para touros de rebanho de elite (Tabela 51). Com base nos dados de intervalo de confiança (Esquema 15) observa-se mais claramente esta diferença, e pode-se dizer ainda que os valores Feulgen-DNA de espermatozoides de touros da raça Pê-duro são mais baixos que os de animais de rebanho de elite. Por outro lado, os valores Feulgen-DNA para núcleos anômalos não apresentam diferença estatisticamente significativa nem a 5% (Tabela 52 e Esquema 16).

TABELA 49 - VALORES FEULGEN-DNA MÉDIOS EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE E DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO.

TOUROS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)	N
1. Rebanho de elite	36,44	$\pm$	3,46	9,38	200
2. Pé-duro	34,29	$\pm$	3,10	9,04	200

ESQUEMA 15 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 3,46.

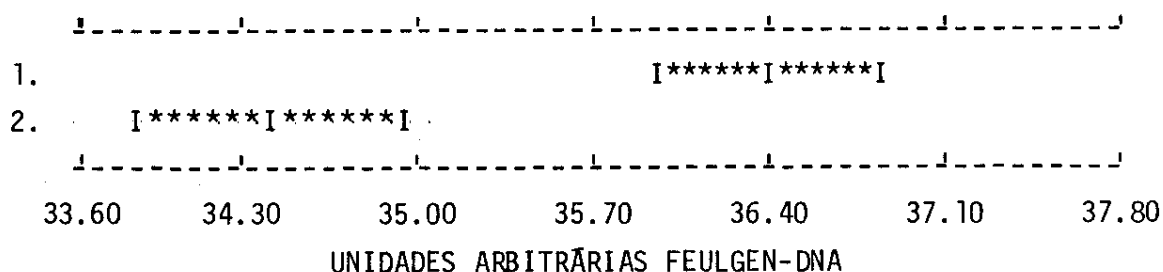


TABELA 50 - VALORES FEULGEN-DNA MÉDIOS EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE E DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO.

TOUROS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)	N
1. Rebanho de elite	43,9	$\pm$	17,2	39,18	200
2. Pé-duro	40,8	$\pm$	15,8	38,73	172

ESQUEMA 16 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 16,60

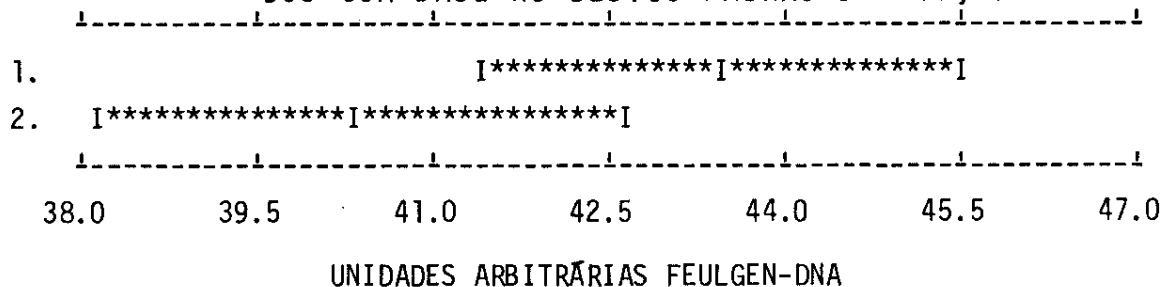


TABELA 51 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES FEULGEN-DNA DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE X PÉ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	464,0	464,0	38,68**
Resíduo	398	4774,8	12,0	
TOTAL	399	5238,8		

F(0,01) crítico = 6,70; F(0,005) = 7,97

\*\*Altamente significativa

TABELA 52 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES FEULGEN-DNA DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE X PÉ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	895,0	895,0	3,25
Resíduo	370	101643,0	275,7	
TOTAL	371	102538,0		

F(0,01) crítico = 6,70

Não significativa

Considerando-se que os touros Pé-duro 8 e 9 e o mestiço (10) apresentaram valores Feulgen-DNA médios muito baixos em relação aos demais (Tabela 35), a suposição de que estes valores poderiam ter influenciado diretamente o resultado, conduziu à realização de uma análise de variância para uma nova comparação dos valores entre as duas amostras, fazendo-se a exclusão na segunda amostra, dos touros citados acima.

Os valores Feulgen-DNA médios obtidos a partir do total de medidas efetuadas para cada amostra, como também os intervalos de confiança obtidos com base nos valores médios e desvio padrão  $S=7,87$  são apresentados na Tabela 53 e Esquema 17, respectivamente. A análise de variância demonstrou então não existir diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras (Tabela 54). Da mesma forma, a dispersão entre os dados para os touros da raça Pê-duro reduziu-se sensivelmente, o que é demonstrado pelos valores do desvio padrão, coeficiente de variação e intervalos de confiança (Tabelas 49 e 53; Esquemas 15 e 17). Por outro lado, com respeito aos valores de área (Tabelas 55 a 58; Esquemas 18 e 19) os núcleos normais de espermatozoides de touros de rebanho de elite são diferentes ao nível de 5% dos de touros da raça Pê-duro (Tabela 57); com respeito aos núcleos anômalos não existe diferença estatisticamente significativa nem ao nível de 5% (Tabela 58).

TABELA 53 - VALORES FEULGEN-DNA MÉDIOS EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE E DE TOUROS DA RAÇA PÉ-DURO. (EXCLUINDO-SE OS TOUROS 8, 9 E 10).

TOUROS	$\bar{X}$	$\pm$	S	C.V.(%)	N
1. Rebanho de elite	36,44	$\pm$	3,46	9,38	200
2. Pé-duro	35,69	$\pm$	2,02	5,66	140

ESQUEMA 17 - INTERVALOS DE CONFIANÇA, AO NÍVEL DE 95%, OBTIDOS COM BASE NO DESVIO PADRÃO S = 7,87.

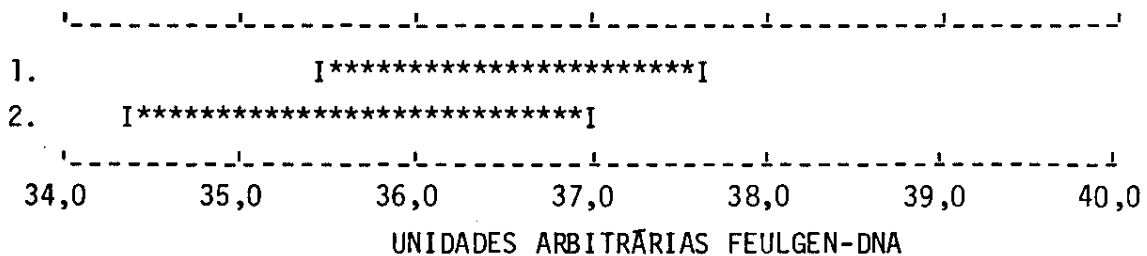


TABELA 54 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES FEULGEN-DNA PARA NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE X PÉ-DURO (EXCLUINDO-SE OS TOUROS 8, 9 E 10).

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	25,35	25,35	0,41
Resíduo	338	20916,05	61,88	
TOTAL	339	20941,40		

F(0,01) crítico = 6,71  
 Não significativa





TABELA 57 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE ÁREA DE NÚCLEOS NORMAIS DE ESPERMATOZÓIDES DE TÓUROS DE REBANHO DE ELITE X PÉ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	71,3	71,3	4,55
Resíduo	398	6233,5	15,7	
TOTAL	399	6304,8		

F(0,01) crítico = 6,70; F(0,05) crítico = 3,86.  
 Não significativa

TABELA 58 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE ÁREA DE NÚCLEOS ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TÓUROS DE REBANHO DE ELITE X PÉ-DURO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	14,7	14,7	0,17
Resíduo	398	31806,0	86,0	
TOTAL	399	31820,7		

F(0,01) crítico = 6,70; F(0,05) crítico = 3,86  
 Não significativa

#### 4.3 - DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DIFERENTES RESPOSTAS NUCLEARES À REAÇÃO DO "FAST GREEN" ALCALINO

Além do cálculo da frequência relativa de núcleos morfológicamente normais e anômalos com remoção de proteínas nucleares, quando submetidos à reação do "fast green" alcalino, foram feitas comparações de respostas entre os mesmos através de análise de variância e de teste *t*. Para a realização das análises estatísticas, os dados percentuais foram normalizados e homogeneizados pela fórmula:  $\arcsen \sqrt{p}$ , pois se tratam de dados de proporção. Os valores de F obtidos foram comparados empregando-se tabelas de distribuição de F conforme OWEN (1962). A maior parte da população nuclear normal e toda a população nuclear anômala, tanto para espermatozoides de touros de rebanho de elite como de gado da raça Pêduro, embora fixados diferentemente, exibiram aspecto "vacuolizado" após esta reação (Figuras, 4,5 e 6).

##### 4.3.1 - REBANHO DE ELITE

O cálculo das frequências relativas de núcleos normais e anômalos, com remoção e sem aparente remoção de proteína nuclear, quando fixados em formaldeído e etanol, são apresentados nas Tabelas 59 e 60, respectivamente. O percentual de núcleos normais com remoção de proteína nuclear, tanto para os núcleos fixados em formaldeído, como para aque

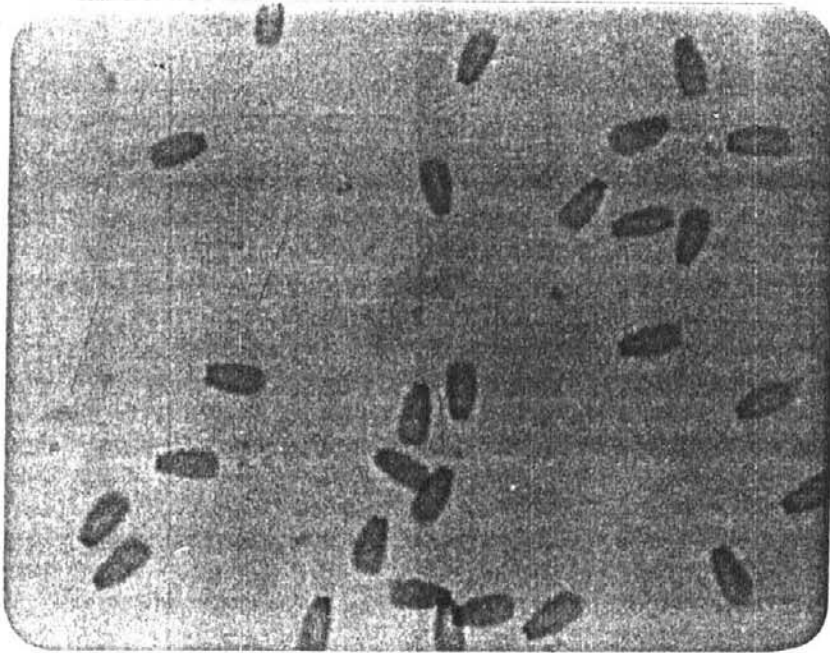


Figura 4  
Núcleos fixados  
em etanol-ácido  
acético, submetidos ao método do "fast green" alcalino e exibindo remoção de material. X 768.

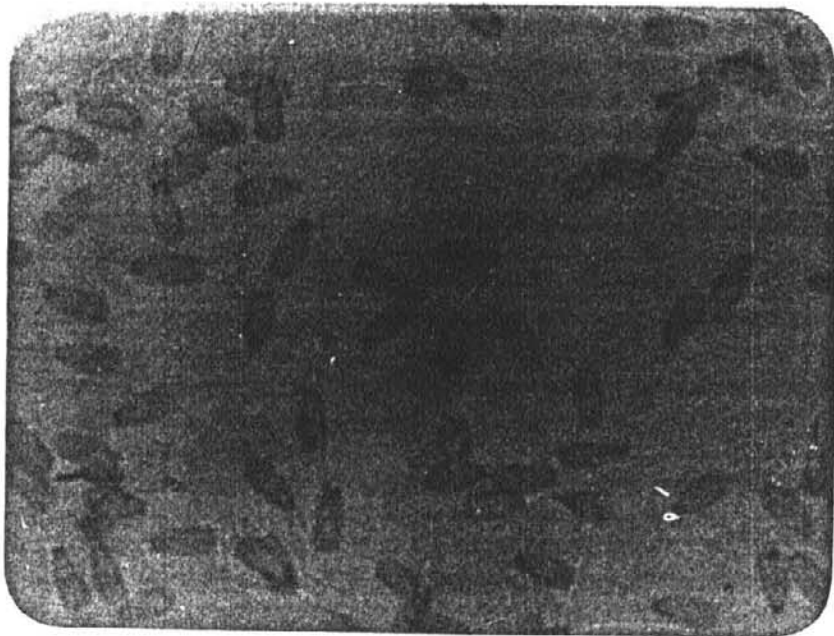


Figura 5  
Núcleos fixados  
em formaldeído  
submetidos ao método do "fast green" alcalino e exibindo remoção de material. X 768.



Figura 6  
Idem à figura 5, porém mostrando em detalhe a remoção de proteína nuclear. X 4.400.

les fixados em etanol foi superior a 85% (Tabelas 59 e 60). O percentual de núcleos normais aparentemente sem remoção de proteína, não excedeu 12,5% em preparados fixados em etanol-ácido acético e 3,2% em preparados fixados em formaldeído (Tabelas 59 e 60). No caso dos núcleos anômalos, todos apresentaram remoção de proteína nas duas condições de fixação. Considerando-se a participação destes núcleos no total de núcleos examinados por touro, encontrou-se uma variação de 1,0 a 5,8% de núcleos suscetíveis à remoção de proteína contribuídos por núcleos de morfologia anômala (Tabelas 59 e 60).

TABELA 59 - FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE NORMAIS E ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE (*Bos taurus*) FIXADOS EM ETANOL-ÁCIDO ACÉTICO E SUBMETIDOS À REAÇÃO DO "fast green" ALCALINO, APRESENTANDO OU NÃO REMOÇÃO DE PROTEÍNA.

CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS (A+B)	NÚCLEOS NORMAIS				NÚCLEOS ANÔMALOS		
		COM REMOÇÃO	SEM APARENTE REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO	% SEM APARENTE REMOÇÃO	COM REMOÇÃO	SEM REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO
3 A B	1.013	920	51	90,82	5,03	42	-	4,15
4 A B	1.600	1.372	200	85,75	12,50	28	-	1,75
6 A B	1.011	958	42	94,76	4,15	11	-	1,09
7 A B	1.143	1.010	120	88,36	10,50	13	-	1,14
8 A B	1.190	1.055	74	88,66	6,22	61	-	5,12
TOTAL	5.957	5.315	487	89,22	8,18	155	-	2,60

- = não observado

TABELA 60 - FREQUENCIA DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE NORMAIS E ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE (*Bos taurus*) FIXADOS EM FORMALDEÍDO E SUBMETIDOS À REAÇÃO DO "fast green" ALCALINO, APRESENTANDO OU NÃO REMOÇÃO DE PROTEÍNA.

CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS (A+B)	NÚCLEOS NORMAIS				NÚCLEOS ANÔMALOS		
		COM REMOÇÃO	SEM APARENTE REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO	% SEM APARENTE REMOÇÃO	COM REMOÇÃO	SEM REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO
A	918	859	18	93,57	1,96	41	-	4,47
B								
A	1 486	1 413	31	95,08	2,09	42	-	2,83
B								
A	997	967	20	96,99	2,01	10	-	1,00
B								
A	1 093	1 053	25	96,34	2,29	15	-	1,37
B								
A	1 202	1 094	38	91,02	3,16	70	-	5,82
B								
TOTAL	5 696	5 386	132	94,56	2,32	178	-	3,12

- = não observado

Os resultados da análise de variância para a frequência de núcleos normais e do teste  $t$  para a frequência de núcleos anômalos, comparando-se as duas condições de fixação, são apresentados nas Tabelas 61 e 62, respectivamente. Os resultados da análise de variância demonstraram que uma diferença entre os núcleos normais embora fixados diferentemente, sô é estatisticamente significativa ao nível de 5% (Tabela 61). Por outro lado, os resultados do teste  $t$  demonstraram não existir diferença significativa nem a 5%, na população nuclear anômala, com respeito à remoção de proteína nuclear (Tabela 62).

Como os resultados, tanto da análise de variância para núcleos normais, como também do teste  $t$  para núcleos anômalos não demonstraram diferença estatisticamente significativa ao nível de 1%, aceita-se a hipótese  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  já que as médias comparadas não diferem significativamente.

TABELA 61 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS DADOS DA FREQUÊNCIA PERCENTUAL DE NÚCLEOS NORMAIS COM REMOÇÃO DE PROTEÍNA NUCLEAR APRESENTADOS NAS TABELAS 59 E 60 COMPARANDO-SE FIXAÇÕES EM FORMOL X ETANOL.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	70,94	70,94	6,99*
Resíduo	8	81,19	10,15	
TOTAL	9	152,13		

$F(0,01)$  crítico = 11,3;  $F(0,05)$  crítico = 5,32

\*Significante ao nível de  $P_{0.05}$



TABELA 62 - TESTE  $t$  PARA OS DADOS DA FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS ANÔMALOS COM REMOÇÃO DE PROTEÍNA NUCLEAR APRESENTADOS NAS TABELAS 61 E 62 COMPARANDO-SE FIXAÇÕES EM FORMOL X ETANOL

HIPÓTESES	$\bar{X}$	GL	$t$ OBTIDO
$H_0: \mu_1 = \mu_2$	$\bar{X}_1 = 30,996$	8	0,131
$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\bar{X}_2 = 29,908$		

$t(0,05)$  crítico = 2,306  
 Não significante

#### 4.3.2 - GADO PÉ-DURO

O cálculo das frequências relativas de núcleos normais e anômalos com remoção e sem aparente remoção de proteína nuclear, quando fixados em formaldeído e etanol, são apresentados nas Tabelas 63 e 64, respectivamente.

O percentual de núcleos normais com remoção de proteína nuclear tanto para os núcleos fixados em formaldeído como para aqueles fixados em etanol, foi superior a 81% (Tabelas 63 e 64). Por outro lado, o percentual de núcleos normais aparentemente sem remoção de proteína, do mesmo modo que aconteceu para os espermatozoides de touros de rebanho de elite, não excedeu 12,5% em preparados fixados em etanol-ácido acético e 4,1% em preparados fixados em formaldeído (Tabelas 63 e 64). No caso dos núcleos anômalos, a semelhança do que se observou para os animais de rebanho de elite, foi sempre encontrada remoção de proteína nuclear. Houve uma variação de 1,25 a 12,80% de núcleos suscetíveis à remoção de proteína, contribuídos pelos núcleos de morfologia anômala (Tabelas 63 e 64).

TABELA 63 - FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE NORMAIS E ANÔMALOS DE ESPERMATOZOÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PE-DURO FIXADOS EM FORMALDEÍDO E SUBMETIDOS À REAÇÃO DO "fast green"ALCALINO, APRESENTANDO OU NÃO REMOÇÃO DE PROTEÍNA.

CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS (A+B)	NÚCLEOS NORMAIS				NÚCLEOS ANÔMALOS		
		COM REMOÇÃO	SEM APARENTE REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO	% SEM APARENTE REMOÇÃO	COM REMOÇÃO	SEM REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO
A	594	499	19	84,00	3,20	76	-	12,80
B								
A	436	401	18	91,97	4,13	17	-	3,90
B								
A	1 540	1 428	23	92,73	1,49	89	-	5,78
B								
A	1 603	1 552	25	96,82	1,56	26	-	1,62
B								
A	1 597	1 540	37	96,43	2,32	20	-	1,25
B								
TOTAL	5 770	5 420	122	93,93	2,12	228	-	3,95

- = não observado

TABELA 64 - FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE NORMAIS E ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PE-DURO FIXADOS EM ETANOL-ÁCIDO ACÉTICO E SUBMETIDOS À REAÇÃO DO "fast green" ALCALINO, APRESENTANDO OU NÃO REMOÇÃO DE PROTEÍNA.

CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS (A+B)	NÚCLEOS NORMAIS				NÚCLEOS ANÔMALOS			
		COM REMOÇÃO	SEM APARENTE REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO	% SEM APARENTE REMOÇÃO	COM REMOÇÃO	SEM REMOÇÃO	% COM REMOÇÃO	% SEM REMOÇÃO
1 A B	663	537	48	81,00	7,24	78	-	11,76	
2 A B	485	436	37	89,90	7,63	12	-	2,47	
3 A B	1 579	1 345	152	85,18	9,63	82	-	5,19	
4 A B	1 535	1 315	190	85,67	12,38	30	-	1,95	
5 A B	1 560	1 366	173	87,56	11,09	21	-	1,35	
TOTAL	5 822	4 999	600	85,86	10,31	223	-	3,83	

- = não observado

Os resultados da análise de variância para a frequência de núcleos normais e do teste  $t$  para a frequência de núcleos anômalos, comparando-se as duas condições de fixação empregada, são apresentados nas Tabelas 65 e 66, respectivamente. A análise de variância demonstrou que uma diferença entre os núcleos normais embora fixados diferentemente, sô é estatisticamente significativa ao nível de 5% (Tabela 65). Por outro lado, o teste  $t$  demonstrou não existir diferença significativa, nem a 5%, na população nuclear anômala, com respeito à remoção de proteína nuclear (Tabela 68). Da mesma forma que para os touros de rebanho de elite, como os resultados da análise de variância para núcleos normais e teste  $t$  para núcleos anômalos não demonstraram diferença estatisticamente significativa ao nível de 1%, aceita-se a hipótese  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  já que não existe diferença significativa entre as médias comparadas.

TABELA 65 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS DADOS DA FREQUÊNCIA PERCENTUAL DE NÚCLEOS NORMAIS COM REMOÇÃO DE PROTEÍNA NUCLEAR APRESENTADOS NAS TABELAS 63 E 64 COMPARANDO-SE FIXAÇÕES EM FORMOL X ETANOL.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	108,87	108,87	6,04*
Resíduo	8	144,17	18,02	
TOTAL	9	253,04		

F(1%) crítico = 11,3; F(5%) = 5,32

\*Significante ao nível de  $P_{0.05}$

TABELA 66 - TESTE  $t$  PARA OS DADOS DA FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS ANÔMALOS APRESENTADOS NAS TABELAS 65 E 66 COMPARANDO O FORMOL X ETANOL

HIPÓTESES	$\bar{X}$	GL	$t$ OBSERVADO
Ho: $\mu_1 = \mu_2$	$\bar{X}_1 = 30,706$	8	0,265
Ho: $\mu_1 \neq \mu_2$	$\bar{X}_2 = 28,744$		

$t(5\%)$  crítico = 2,306  
 Não significativa.

#### 4.4 - COMPORTAMENTO NUCLEAR FRENTE À HIDRÓLISE ÁCIDA, MEDIDO POR ALTERAÇÕES EM CARACTERÍSTICAS DE BASOFILIA

A metacromasia nuclear induzida com azul de toluidi na a pH 4,0 pôde ser detectada em núcleos morfológicamente normais e anômalos de espermatozôides de touros de rebanho de elite, como também nos de gado da raça Pê-duro. Essa característica pode ser observada nas Figuras 7 e 8.

Para a determinação da frequência percentual de núcleos normais e anômalos metacromáticos, inicialmente, fez-se uma estimativa da população nuclear morfológicamente normal e anômala presente no esfregaço de sêmen de cada touro em estudo. A frequência total foi obtida através da contagem de 520 campos microscópicos seqüenciais, nas lâminas submetidas à reação de Feulgen. Considerando-se que o volume de sêmen depositado em cada lâmina e as condições de esfregaço foram constantes, admite-se que os valores de

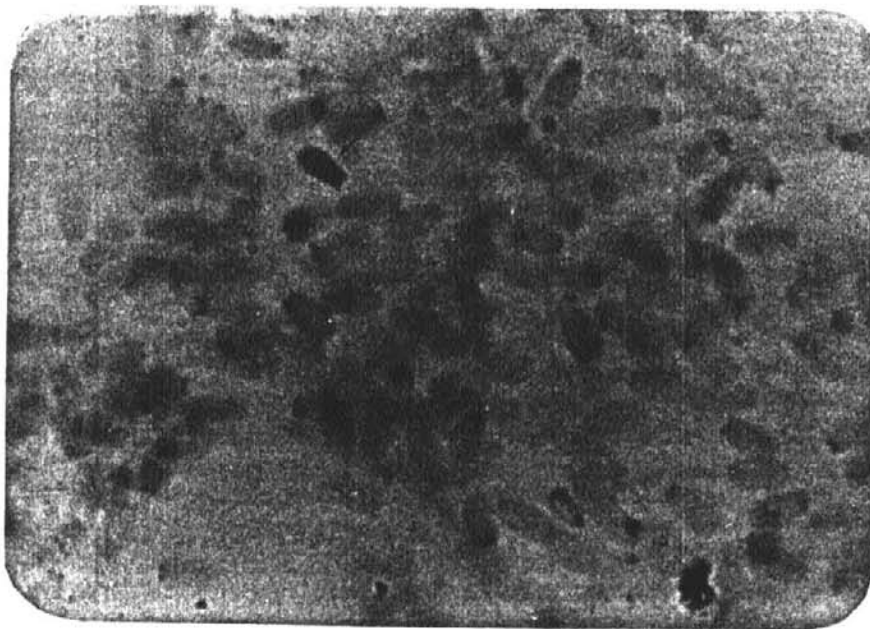


Figura 7 - Esfregaço de sêmen de touro Pê-duro corado com azul de toluidina A pH 4,0 (núcleo morfologicamente normal). X 768.

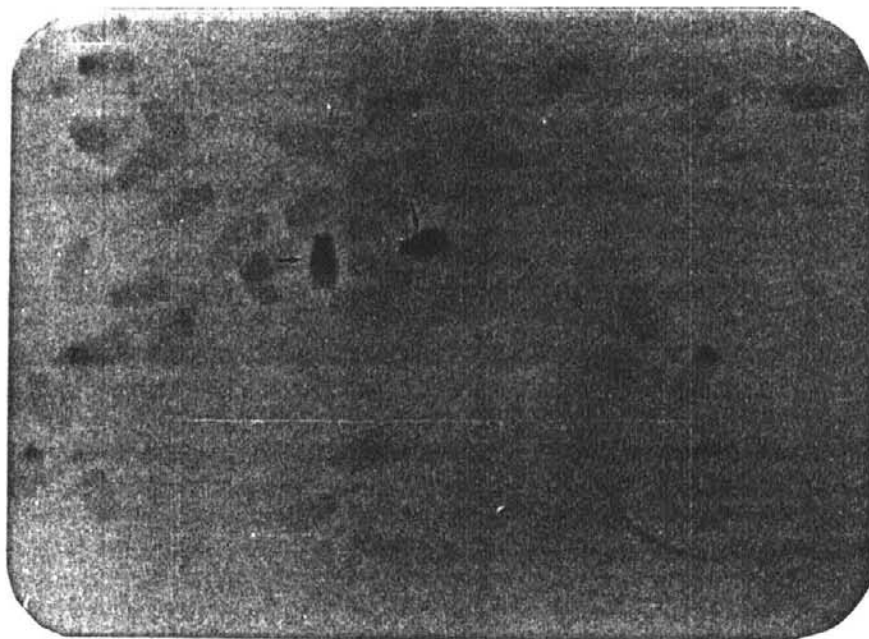


Figura 8 - Idem figura 7, porém mostrando núcleos morfologicamente normal e anômalo. X 768.

contagem obtidos nos preparados submetidos à reação de Feulgen sejam equivalentes aos das lâminas tratadas com azul de toluidina.

#### 4.4.1 - REBANHO DE ELITE

A estimativa da frequência total de núcleos morfologicamente normais e anômalos submetidos à reação de Feulgen acha-se relatada na Tabela 67, e a frequência absoluta de núcleos metacromáticos, em diferentes tempos de hidrólise, na Tabela 68.

A frequência percentual de núcleos metacromáticos foi praticamente nula para a população de núcleos morfologicamente normais. Quanto à população de núcleos de forma anômala, detectou-se uma frequência em torno de 1,0 a 1,6% de núcleos metacromáticos em alguns touros (Tabela 69). Nos touros 3,6,8 (*Bos taurus*) 5 e 10 (*Bos indicus*) este fenômeno foi mais freqüente (Tabela 69).

TABELA 67 - ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA TOTAL DE NÚCLEOS NORMAIS E ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN (520 CAMPOS MICROSCÓPICOS SEQUENCIAIS).

ESPÉCIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS NORMAIS	TOTAL DE NÚCLEOS ANÔMALOS
<i>Bos taurus</i>	3	9 640	928
	4	19 600	700
	6	9 860	268
	7	19 890	500
	8	19 180	1 800
<i>Bos indicus</i>	1	9 800	440
	2	19 540	216
	5	12 550	1 780
	9	10 116	189
	10	10 788	125



TABELA 68 - FREQUÊNCIA ABSOLUTA DE NÚCLEOS METACROMÁTICOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE APÓS TRATAMENTO COM SOLUÇÃO DE AZUL DE TOULUIDINA (AT) A pH 4,0, ESTIMADA EM 520 CAMPOS MICROSCÓPICOS SEQUENCIAIS.

ESPÉCIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	AT pH 4,0 TEMPO DE HIDRÓLISE					
		10 MINUTOS		15 MINUTOS		20 MINUTOS	
		NÚCLEOS		NÚCLEOS		NÚCLEOS	
		NRM	ANM	NRM	ANM	NRM	ANM
<i>Bos taurus</i>	3	5	2	8	12	10	15
	4	8	3	9	5	12	8
	6	3	1	4	3	6	4
	7	7	1	6	3	8	4
	8	10	16	15	18	21	28
<i>Bos indicus</i>	1	3	1	4	3	4	4
	2	6	1	8	1	9	2
	5	4	10	6	20	9	26
	9	3	1	5	1	5	1
	10	2	1	4	1	8	2

NRM = Núcleos de morfologia normal.  
ANM = Núcleos anômalos

TABELA 69 - FREQUÊNCIA PERCENTUAL DE NÚCLEOS METACROMÁTICOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DE REBANHO DE ELITE APÓS TRATAMENTO COM SOLUÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA (AT) A pH 4,0, ESTIMADA EM 520 CAMPOS MICROSCÓPICOS SEQUENCIAIS

ESPÉCIE ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	AT pH 4,0 TEMPO DE HIDRÓLISE					
		10 MINUTOS		15 MINUTOS		20 MINUTOS	
		NÚCLEOS		NÚCLEOS		NÚCLEOS	
		NRM	ANM	NRM	ANM	NRM	ANM
<i>Bos taurus</i>	3	0,0	0,2	0,1	1,3	0,1	1,6
	4	0,0	0,4	0,0	0,7	0,1	1,1
	6	0,0	0,4	0,0	1,1	0,1	1,5
	7	0,0	0,2	0,0	0,6	0,0	0,8
	8	0,1	0,9	0,1	1,0	0,1	1,6
<i>Bos indicus</i>	1	0,0	0,2	0,0	0,7	0,0	0,9
	2	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,9
	5	0,0	0,6	0,0	1,1	0,1	1,5
	9	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5
	10	0,0	0,8	0,0	0,8	0,1	1,6

NRM = Núcleos de morfologia normal  
ANM = Núcleos anômalos

#### 4.4.2 - GADO PÊ-DURO

A estimativa da frequência total de núcleos morfologicamente normais e anômalos em gado Pê-duro e mestiço após a reação de Feulgen, se encontra na Tabela 70 e a frequência absoluta de núcleos metacromáticos, em diferentes tempos de hidrólise, na Tabela 71.

Nos touros da raça Pê-duro e no mestiço, a frequência de núcleos metacromáticos foi mais elevada que em touros de rebanho de elite e detectada em maior número de animais da amostra, fenômeno este observado principalmente na população nuclear morfologicamente anômala (Tabelas 69 e 72). Com exceção dos touros 4, 5 e 7, todos os demais apresentaram núcleos anômalos metacromáticos, mas somente nos touros da raça Pê-duro 8 e 9 e no touro mestiço (10) detectaram-se núcleos metacromáticos, em frequência significativa, em espermatozoides normais quanto à morfologia (Tabelas 71 e 72). Estes últimos são animais que por sua vez apresentam também outras características que comprometem a sua capacidade fertilizante como: baixo número de espermatozoides no ejaculado (Touros 8 e 9) e alto percentual de anomalias de cabeça (Touros 8,9 e 10). A frequência de núcleos metacromáticos morfologicamente normais e anômalos variou em torno de 1,0 a 13,6%.

TABELA 70 - ESTIMATIVA DE FREQUÊNCIA TOTAL DE NÚCLEOS NORMAIS E ANÔMALOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO SUBMETIDOS À REAÇÃO DE FEULGEN (520 CAMPOS MICROSCÓPICOS SEQUENCIAIS).

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	TOTAL DE NÚCLEOS NORMAIS	TOTAL DE NÚCLEOS ANÔMALOS
Pê duro	1	9 908	1 480
	2	4 800	120
	3	17 580	1 720
	4	16 700	180
	5	17 928	230
	6	1 080	85
	7	18 340	456
	8	1 100	59
	9	1 460	184
*SRD Mestiço	10	9 001	629

\*SRD = Sem raça definida

TABELA 71 - FREQUÊNCIA ABSOLUTA DE NÚCLEOS METACROMÁTICOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO APÓS TRATAMENTO COM SOLUÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA (AT) A pH 4,0, ESTIMADA EM 520 CAMPOS MICROSCÓPICOS SEQUENCIAIS.

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	AT pH 4,0 TEMPO DE HIDRÓLISE					
		10 MINUTOS		15 MINUTOS		20 MINUTOS	
		NÚCLEOS		NÚCLEOS		NÚCLEOS	
		NRM	ANM	NRM	ANM	NRM	ANM
Pê-duro	1	20	50	45	68	76	225
	2	2	1	2	1	5	2
	3	25	12	28	19	93	36
	4	6	1	5	1	9	1
	5	8	1	21	1	99	2
	6	4	1	5	1	7	2
	7	15	1	35	2	55	4
	8	11	2	21	3	63	8
	9	23	3	28	5	33	9
*SRD Mestiço	10	92	12	189	17	201	28

\*SRD = Sem raça definida  
 NRM = Núcleo de morfologia normal  
 ANM = Núcleos anômalos

TABELA 72 - FREQUÊNCIA PERCENTUAL DE NÚCLEOS METACROMÁTICOS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS DA RAÇA PÊ-DURO APÓS TRATAMENTO COM SOLUÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA (AT) A pH 4,0, ESTIMADA EM 520 CAMPOS MICROSCÓPICOS SEQUENCIAIS.

RAÇA ANIMAL	CÓDIGO DAS LÂMINAS	AT pH 4,0 TEMPO DE HIDRÓLISE					
		10 MINUTOS		15 MINUTOS		20 MINUTOS	
		NÚCLEOS		NÚCLEOS		NÚCLEOS	
		NRM	ANM	NRM	ANM	RRM	ANM
Pê-duro	1	0,2	0,5	0,5	0,7	0,8	2,3
	2	0,0	0,8	0,0	0,8	0,1	1,7
	3	0,1	0,7	0,2	1,1	0,5	2,1
	4	0,0	0,6	0,0	0,6	0,1	0,6
	5	0,0	0,4	0,1	0,4	0,6	0,9
	6	0,4	1,2	0,5	1,2	0,6	2,4
	7	0,1	0,2	0,2	0,5	0,3	0,9
	8	1,0	3,4	1,9	5,1	5,7	13,6
	9	1,6	1,6	1,9	2,7	2,3	4,9
	*SRD Mestiço	10	1,0	1,9	2,1	2,7	2,2

\*SRD = Sem raça definida  
 NRM = Núcleo de morfologia normal  
 ANM = Núcleos anômalos

## 5. D I S C U S S Ã O

### 5.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com os procedimentos usados neste trabalho, excluindo-se o método do "*fast green*" alcalino, foram detectadas anomalias morfológicas de cabeça e anomalias em resposta citoquímica para a cromatina em espermatozoides de touros de rebanho de elite e de gado "pê-duro".

Quanto à decisão sobre a viabilidade de se considerar animais "pês-duros" doadores de sêmen, com base nesses dados, há indicação de que pelo menos 50% desses animais (n<sup>os</sup>. 2,4,5,6,7) apresentam qualidades tão boas quanto as da maioria dos animais de rebanho de elite, tidos como de alto nível zootécnico (J. FONSECA - informação pessoal). Essas qualidades se referem a baixo percentual de anomalias de cabeça, valores Feulgen-DNA e áreas nucleares dentro do padrão normal, e baixo nível de metacromasia induzida nas células morfolologicamente normais. Além disso, observações à parte indicaram que a concentração de espermatozoides e seu grau de motilidade no ejaculado se apresentaram normais para esses espécimes.

Trinta por cento (30%) dos espécimes "pês-duros" analisados (n<sup>os</sup>. 8,9 e 10) (incluindo, portanto, o mestiço) apresentaram valores Feulgen-DNA muito abaixo do normal (11,2 a 14,3%) e simultaneamente os maiores percentuais de metacromasia induzida, em espermatozoides de morfologia normal. Por outro lado, esses mesmos animais apresentaram espermatozoides com níveis de defeitos de cabeça no limite de tolerância (acima de 10%, porém abaixo de 20%) (VALE FILHO *et alii*, 1978). Não são, contudo, indicados como doadores de sêmen, uma vez que as características citoquímicas dos espermatozoides aparentemente normais indicam anomalias cromatínicas que poderiam comprometer o poder fertilizante dessas células (GLEDHILL, 1966, 1970a; GLEDHILL *et alii*, 1966a; MELLO, 1982). Em favor dessa idéia há também a observação adicional de que os animais mencionados exibiram um número reduzido de espermatozoides no ejaculado.

Vinte por cento (20%) dos touros "pês-duros" (n<sup>os</sup>. 1 e 3), com espermatozoides portadores de uma frequência de patologia de cabeça acima de 20% (predominantemente de feitos maiores) não mostraram nos espermatozoides morfologicamente normais características citoquímicas que os discriminassem como anômalos. No entanto, o percentual de anomalias morfológicas é suficiente para desaconselhar a utilização do sêmen desses animais para inseminação artificial (VALE FILHO *et alii*, 1978).

Tais índices de aproveitamento como doadores, para o gado "pê-duro", não são inesperados, uma vez que vem



sendo relatada baixa reprodutividade (40%) para os animais do rebanho piauiense, conforme Censo Agropecuário/Piauí (1980).

Deve-se salientar, no entanto, que essas características indesejáveis podem estar associadas à condição física dos animais na época da coleta do sêmen. É possível que o fornecimento de alimentação suplementar e cuidados de ordem higiênico-sanitária a esses animais, possa levá-los à melhoria de seu nível zootécnico (KOGER, 1975).

Ao contrário do que se esperava, mesmo no plantel de elite utilizado neste trabalho, foram encontrados espécimes cujos espermatozoides apresentavam patologia de cabeça quase acima dos níveis aceitos como normais. Nesses animais (*Bos taurus*, nºs. 3 e 8 e *Bos indicus*, nº 5) predominaram os defeitos maiores. No entanto, em termos citológicos, não exibiram alterações tão drásticas como as relatadas para os 30% dos animais "pês-duros". Mesmo assim, especialmente o animal de nº 5 não poderia ser considerado em condições ótimas como doador.

## 5.2 - ANOMALIAS DE FORMA DE CABEÇA DOS ESPERMATOZÓIDES: INFORMAÇÕES ADICIONAIS

As anomalias detectadas conforme descrição neste trabalho seriam indicativas de ocorrência de distúrbios adquiridos (e não congênitos) por degeneração no epitélio

dos túbulos seminíferos (LAGERLÖF, 1936, 1938). Isto se aplicaria especialmente aos touros "pês-duros", considerados não viáveis como doadores de sêmen (n<sup>os</sup>. 1,8,9), e a um dos animais do rebanho de elite (n<sup>o</sup> 5), também não indicado para esse propósito, nos quais a anormalidade do tipo "*pouch formation*" era mais evidente. A frequência alta dessa anomalia, associada à presença de fases imaturas das células germinativas e leucócitos, como constatado nos touros "pês-duros" n<sup>os</sup>. 8 e 9, durante a observação dos preparados submetidos à reação de Feulgen, parece indicar um quadro de fase aguda de processo degenerativo testicular (BANE & NICANDER, 1965).

Nos animais de elite, uma certa tendência a apresentarem os espécimes de *Bos taurus* espermatozoides com mais anomalias de cabeça do que os *Bos indicus* (embora estas na maioria dos casos se apresentassem abaixo do nível crítico) foi também relatada anteriormente por VALE FILHO *et alii* (1978).

### 5.3 - VALORES FEULGEN-DNA E O CONTEÚDO DE DNA DOS ESPERMATOZÓIDES DE TOURO

Os cromossomos de *Bos taurus* e *Bos indicus* não diferem em número ( $2n = 60$ ), embora o cromossomo Y nas raças europeias seja submetacêntrico, enquanto nas raças asiáticas é acrocêntrico (KIEFER & CARTWRIGHT, 1968; WURSTER & BENIRSCHKE, 1968;

HALNAN & WATSON, 1982). Por outro lado, não parece haver diferença significativa entre o conteúdo de DNA das duas espécies bovinas, medido através de valores Feulgen-DNA.

Embora sejam detectadas variações individuais em valores Feulgen-DNA, os animais "pês-duros", com exceção dos de nº 8,9 e 10 (mestiço), não diferem dos de elite. As diferenças citadas, excluídas as referentes aos touros "pês-duros" 8,9 e 10, podem ser devidas a pequenas variações em compactação cromatínica (níveis supra-organizacionais) associadas a variações de área nuclear, que não afetariam o bom desempenho fertilizante dos espermatozoides. Esse tipo de variação foi também relatado previamente por GLEDHILL (1966). Também, WELCH & RESCH (1960) comprovaram que uma pequena redução na média do conteúdo Feulgen-DNA de espermatozoides de touros Santa Gertrudes não implica em redução da fertilidade dos mesmos.

No geral, alterações nos complexos DNA-proteína que levariam a uma depuração mais rápida quando da reação de Feulgen e que se refletiriam na fertilidade do animal, elevam em aproximadamente 70-80% os valores Feulgen-DNA de espermatozoides ejaculados (GLEDHILL, 1970a). No caso dos espermatozoides dos animais "pês-duros" as diferenças se referem a 11,2 a 14,3% aos valores normais. Porém, ao contrário do que se verificou no caso estudado por GLEDHILL (1970a), houve decréscimo nos valores Feulgen-DNA, o que pode indicar não só maior depuração, mas também velocidade acelerada de solubilização do ácidoapurínico nesses espermatozoides. Isto seria causado por uma interação me-

nos íntima das proteínas com o DNA, expondo o DNA mais facilmente tanto a ação de depuração como de solubilização pelo HCl (MELLO, 1979; MELLO & VIDAL, 1980; SILVA & MELLO, 1986), o que seria também drástico como no caso reportado por GLEDHILL (1970a). Explicaria também os resultados de metacromasia induzida para os espermatozoides morfológicamente normais dos mesmos animais "pés-duros".

Assim, não se trata de uma ocorrência generalizada de aneuploidias nos três touros "pés-duros" cujos espermatozoides apresentavam características citoquímicas sensivelmente alteradas.

Deve-se ressaltar que determinações citoquímicas e bioquímicas não têm comprovado diferenças em conteúdo de DNA relacionadas com infertilidade em touros (LEUCHTENBERGER, 1960; SUMMERHILL & OLDS, 1961; KRAMER, 1968; GLEDHILL, 1970b). Contudo, 76% da população nuclear de espermatozoides de touros subfêrteis apresentam DNA mais sensível à denaturação térmica (EVENSON *et alii*, 1980). Além disso, em touros com severa redução de fertilidade comprovaram-se sensíveis alterações a nível de proteína nuclear básica (GLEDHILL *et alii*, 1966a).

Esses fenômenos explicariam, pois, o fato do DNA desse complexo nucleoproteico apresentar uma reação diferencial frente a hidrólise da reação de Feulgen.

#### 5.4 - METACROMASIA NUCLEAR INDUZIDA

A basofilia nuclear em preparados corados com solu

ção de azul de toluidina a pH 4,0 se deve à presença de ácidos nucleicos, pois as moléculas do corante se ligam eletrostaticamente aos grupos fosfatos do substrato (LISON, 1960; MIURA & OHBA, 1967). A basofilia é metacromática quando a curva espectral de absorção para o substrato corado com azul de toluidina salienta o máximo de absorção em  $\lambda = 540-560$  nm ( $\gamma$ ) ou  $\lambda = 570-580$  nm ( $\beta$ ), ou seja, aparecimento de cor violeta ou violeta azulada, respectivamente (LISON, 1960).

Os espermatozoides de touro não apresentam metacromasia, senão quando sua protamina é descomplexada do DNA (MELLO, 1982). Entretanto, quando o complexo DNA-proteína desses espermatozoides é anômalo, é induzida uma metacromasia nuclear, desde que se proceda a uma hidrólise ácida antes da coloração (MELLO; 1982). Esse método citoquímico tem revelado maior porcentagem de espermatozoides metacromáticos, porém morfológicamente normais, em touros subfêrteis (MELLO, 1982).

No presente trabalho, os dados mais relevantes quanto à metacromasia se referem justamente aos espermatozoides de morfologia normal. Sua frequência, quando alta, como nos animais "pês-duros" de nºs. 8,9 e 10 (mestiço), está associada a outras alterações citoquímicas e morfológicas, o que permite diagnosticar a subfertilidade dos mesmos.

Embora a frequência de núcleos metacromáticos, tanto morfológicamente normais como anômalos, tenha sido maior no tempo de hidrólise de 20 minutos, é importante

salientar que se existe alterações no complexo DNA-proteína, a metacromasia nuclear induzida em espermatozoides é detectável após 10, 15 e 20 minutos de hidrólise. Apenas no tempo de 20 minutos, o fenômeno é mais visível, facilitando as contagens ao microscópio.

#### 5.5 - O MÉTODO DO "FAST GREEN" ALCALINO E SUA IMPROPRIEDADE PARA ESTUDO DE PROTEÍNAS NUCLEARES BÁSICAS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOURO

O método do "fast green" alcalino é preferencial para histonas de células somáticas e para proteínas nucleares básicas de alguns tipos de espermatozoides (ALFERT & GESCHWIND, 1953; ALFERT, 1956). No entanto, espermatozoides como os de touro, após fixação em formol, têm sua protamina solubilizada durante a etapa do método em que o DNA é removido com ácido tricloroacético (ALFERT, 1956). A ação do formol se estende também a uma extração não controlada dessa protamina por HCl, afetando a resposta do DNA de espermatozoides de touro à reação de Feulgen (SILVA & MELLO, 1986).

Com base nos dados acima, presumiu-se que uma fixação por metanol acético pudesse alterar o caráter extrativo do tratamento por TCA na reação do "fast green" alcalino. Além disso, supôs-se que células com alterações químicas na protamina, a ponto de responderem diferentemente à

reação de Feulgen ou ao método de metacromasia induzida , como detectado especialmente no gado "pê-duro", pudessem apresentar um fenótipo nuclear sugestivo de não extração de protamina pela reação do "*fast green*" alcalino.

No entanto, ficou demonstrado neste trabalho que a resposta ao método do "*fast green*" alcalino é bastante heterogênea e incontrolável nos espermatozoides de touro. Isto, independente da fixação a que foram submetidos os espermatozoides, do seu tipo morfológico, bem como da raça bovina considerada e do nível de fertilidade de cada animal, suposto com base nas outras características já descritas. As alterações químicas possíveis na protamina desses espermatozoides, portanto, em nada impedem a sua solubilidade frente ao ácido tricloroacético.

O método do "*fast green*" alcalino não é, por conseguinte, recomendável para estudos relativos à proteína nuclear básica de espermatozoides bovinos, mesmo em células com alterações no complexo DNA-proteína.

## 6. CONCLUSÕES

1. Anomalias de forma de cabeça e em resposta citoquímica à reação de Feulgen e metacromasia induzida são detectáveis em espermatozoides de touros de rebanho de elite e de gado "pê-duro".

2. Com base no tipo e frequência dessas características, estima-se que pelo menos 50% de touros "pês-duros" possam ser doadores de sêmen em centrais de inseminação artificial especializadas. Os restantes são desaconselhados como doadores, baseando-se ou no nível crítico de patologia de cabeça ou em percentuais consideráveis de anomalias citoquímicas aliados à frequência reduzida de espermatozoides nos ejaculados. A frequência dos animais de baixo nível zootécnico possivelmente decresça se for efetuado fornecimento de alimentação suplementar e cuidados de ordem higiênico-sanitária, os quais são geralmente deficientes no que se refere a essa raça bovina.

3. Mesmo em rebanho de elite, foram encontrados espécimes cujos espermatozoides apresentaram níveis de patolo



gia de cabeça tais que os teriam tornado, pelo menos na época da coleta de sêmen, não recomendáveis como doadores.

4. As anomalias de cabeça de espermatozoides encontradas são indicativas, pelo menos para a maioria dos animais que as apresentaram, de distúrbios adquiridos, tipo degeneração do epitélio dos túbulos seminíferos.

5. As alterações em valores Feulgen-DNA, em espermatozoides morfológicamente normais, parecem não refletir variações reais em conteúdo de DNA, mas da cinética de hidrólise do DNA na cromatina, por variações em níveis supra-organizacionais da cromatina.

6. As mesmas variações de composição e estrutura da cromatina, admitidas no item 5, explicaram os níveis elevados de metacromasia nuclear induzida para os mesmos animais.

7. O método do "*fast green*" alcalino não é recomendável para estudo de protamina de espermatozoides bovinos, mesmo naqueles em que essa proteína possa estar alterada e diferentemente complexada ao DNA.

## 7. R E S U M O

Espermatozoides de touros da raça "pê-duro" em vias de extinção, foram estudados com relação a anomalias de cabeça e resposta citoquímica à reação de Feulgen, ao método do "*fast green*" alcalino e metacromasia induzida, e comparados aos de touros de rebanho de elite. Os objetivos eram avaliar a propriedade de métodos citoquímicos em diagnosticar alterações cromatínicas em espermatozoides de touro e, com base nesses resultados, estabelecer a viabilidade de se considerar os animais "pês-duros" como doadores de sêmen em centrais de inseminação.

Com exceção do método do "*fast green*" alcalino, os outros revelaram anomalias em espermatozoides de gado "pê-duro" e de plantel de elite. Com base no tipo e frequência dessas características, pelo menos 50% de touros "pês-duros" parecem reunir qualidades de sêmen que os indicariam como doadores potenciais. Os restantes, por apresentarem espermatozoides com níveis altos ou de patologia de cabeça ou de alterações citoquímicas mais frequência reduzida de células no ejaculado, seriam desaconselhados como doadores, pelo menos nas condições zootécnicas em que se

encontravam. Em alguns espécimes de elite foram também detectados níveis altos de patologia de cabeça que os afastariam como doadores.

As anomalias de cabeça, no geral, parecem ser ocasionadas por fenômenos de degeneração testicular não congênitos. Alterações em níveis supra-organizacionais da cromatina se refletiriam na cinética de hidrólise de espermatozoides morfológicamente normais tanto submetidos à reação de Feulgen como à metacromasia induzida.

O método do "*fast green*" alcalino, por outro lado, não se mostrou recomendável para o estudo "*in situ*" de protamina dos espermatozoides de touros, mesmo para aqueles com supostas alterações a nível do complexo DNA-proteína.

## 8. S U M M A R Y

Spermatozoa from "pē-duro" bulls were studied with respect to anomalies of the head and cytochemical methods such as the Feulgen reaction, the alkaline fast green method and induced metachromasy, and the results compared with those obtained from bulls of an elite herd. The object was to evaluate the propriety of cytochemical methods in diagnosing alterations in the chromatin of the spermatozoa of bulls, and based on these results, establish the viability of considering "pē-duro" animals as semen donors in insemination centres.

With the exception of the alkaline fast green method, the tests revealed anomalies in the spermatozoa of the "pē-duro" cattle and the elite herd. Based on the type and frequency of these characteristics, it seems that at least 50% of the "pē-duro" bulls present semen qualities which indicate them as potential donors. The remainder would not be recommended as donors at least under their present zootechnical conditions, due to spermatozoa with either high levels of head pathology or cytochemical alterations, plus a reduced frequency of cells in the ejaculate.

High levels of head pathology were also detected in some of the elite specimens, which eliminated them as donors

In general the head anomalies seemed to be a result of the phenomenon of non-congenital testicular degeneration. Alterations in the chromatin at a supra-organizational level were reflected in the kinetics of hydrolysis of morphologically normal spermatozooids, when submitted both to the Feulgen reaction and to induced metachromasy.

On the other hand the alkaline fast green method was shown to be unsuitable for the "in situ" study of the protamines of bull spermatozooids, even for those with supposed alterations at the level of the DNA-protein complex.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- ALFERT, M. Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.*, 2: 109-114, 1956.
- ALFERT, M. & GESCHWIND, I. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Ac.Sc.*, 39: 991-999, 1953.
- ATHANASSOF, N. Raças de gado comum sem aptidões especializadas. In: *Manual do Criador de Bovinos*. São Paulo, Melhoramento, p.191-214, 1958.
- BANE, A. & NICANDER, L. Pouch formation by imaginations of the nuclear envelope of bovine and porcine sperm as a sign of disturbed spermiogenesis. *Nord. Vet. Med.* 17(11): 628-632, 1965.
- BISHOP, M.W.H.; CAMPBELL, R.C.; HANCOCK, J.L.; WALTON, A. Sêmen characteristics and fertility in the bull. *J. Agric. Sci.*, 44: 227-248, 1954.

- BISHOP, M.W.H. & HANCOCK, J.L. The evaluation of bull semen. *Vet. Rec.*, 67: 363-372, 1955.
- BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. *Fert. Steril.*, 1: 223-238, 1950.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, 25: 383, 1973.
- CARVALHO, J.H. Gado Pê-duro: esperança de preservação. *BNB Notícias*, Fortaleza, 42, p.4, 1983a.
- CARVALHO, J.H. *Relatório de atividades do núcleo de preservação do gado Pê-duro ou Curraleiro*. EMBRAPA - Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual - UEPAE de Teresina. 1984.
- CARVALHO, J.H. & PEREIRA, P.R. Projeto para implantação de um núcleo de preservação de gado "Pê-duro" ou *Curraleiro*. Teresina, EMBRAPA / UEPAE de Teresina, 1981. 17 p.
- CARVALHO, J.H. *et alii*. *Avaliação de bovinos curraleiros em um núcleo de preservação no Estado do Piauí*. EMBRAPA/UEPAE de Teresina, 1983b, 12 p. (Projeto de Pesquisa).
- CENSO AGROPECUÁRIO/PIAUI - *IX Recenseamento Geral do Brasil*, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Es-

estatística (IBGE), Vol.2, Tomo 3, número 8, 1980.

DEITCH, A.D. Citophotometry of proteins. In: *Introduction to quantitative cytochemistry*. Edited by Wied G.L., Acad. Press, New York, p.451-465, 1966.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210: 1131-1133, 1980.

GARCIA, O.S. *Características físicas e morfológicas do sêmen de touros normais e de touros com distúrbios reprodutivos, de raças européias e indianas, criadas no Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte-Brasil, 1971. 61p. Tese. Esc. Vet. UFMG.

GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical area of ejaculated spermatozoal heads from bulls with normal and lowered fertility. *Acta vet. scand.*, 7: 166-174, 1966.

GLEDHILL, B.L. Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility. In: *Introduction to quantitative cytochemistry II* (G.L.Wied, ed.), Acad. Press, N.York e Londres, p. 125-151, 1970a.

GLEDHILL, B.L. Enigma of spermatozoal deoxyribonucleic



acid and male infertility. A review. *Amerc. Vet. Res.*, 31(3): 539-545, 1970b.

GLEDHILL, B.L.; GLEDHILL, M.P.; RIGLER JR. & RINGERTZ, N.R.  
Atypical changes of deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in the bull. *J. Reprod. Fert.* 12: 575-578, 1966a.

GLEDHILL, B.L.; GLEDHILL, M.P.; RIGLER JR. & RINGERTZ, N.R.  
Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. *Exptl. Cell. Res.*, 41: 652-665, 1966b.

HALNAN, C.R.E. & WATSON, J.I. Y chromosome variants in cattle *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Ann. Genet. Sel. anim.*, 14(1): 1-16, 1982.

HERRICK, J.B. & SELF, H.L. *Evaluacion de la fertilidad del toro y del verraco* Zaragoza (España), de la edición española, Editorial Acribia s.d.

KIEFFER, N.M. & CARTWRIGHT, T.C. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. *J. Hered.*, 60: 35-37, 1969.

KOGER, M. Seminário Curso de Pós-Graduação U.S.P., Dep. Genética F. Med. Ribeirão Preto. *Discussão sobre projetos nºs. 615 e 1186 Universidade da Flórida*, 1975. Apud VALLE FILHO, V.R. *et alii*, *op. cit.* ref. 41.

- KRAMER, M.F. DNA content of spermatozoa in fertile and infertile bulls, and errors in its determination. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 8: 217-224, 1968.
- LAGERLÖF, N. Sterility in bulls. *The Vet. Rec.*, 41 (48): 1159-1173, 1936.
- LAGERLÖF, N. Infertility in male domestic animals. *Proc. XIIth. Inter. Vet. Cong.*, Zurich, 1:214 (vol.1) 1938.
- LEUCHTENBERGER, C. The relation of the deoxyribosenucleic acid (DNA) of sperm cells to fertility. In: The effect of germ cell damage on animal reproduction. *J. Dai. Sci. (supl.1)*, 43: 31-50, 1960.
- LISON, L. Réactions fonctionnelles de caractère général liées a la présence de radicaux chimiques définissables. In: *Histochemie et cytochemie animales: Principes et méthodes*. 3. ed. Paris, Gauthier-Villars, 1960. v. 1, cap.X, p.259.
- MELLO, M.L.S. Patterns of habilility towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. *Cell. Mol. Biol.*, 24: 1-16, 1979.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa . *Histochemistry*, 74: 387-392, 1982.

- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. *Cienc. Cult. S.Paulo*, 30(6): 665-676, 1978.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda., 1980, p.57.
- MIURA, A. & OHBA, Y. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 145: 436-445, 1967.
- NOGUEIRA NETO, A.F. *Aspectos da pecuária piauiense*. Teresina, Sociedade de Medicina Veterinária do Piauí, 1980. 7p. (Folheto nº 267 - UEPAE/Te.).
- OWEN, D.B. *F-distribution and multiple comparison*. BIRNBAUM, Z.W. *Handbook of statistical tables*. PALO ALTO. London, Addison-Wesley Publishing Company, Inc., 1962. parte 4, 62-87.
- SANTIAGO, A.A. O Zebu nos cruzamentos. In: *Zebu e Cruzamentos*. São Paulo, Departamento de Produção Animal, 1965, 3a. parte, XIX Cap.
- SILVA, M.J.L. & MELLO, M.L.S. Lability to acid hydrolysis in some different DNA-protein complexes of spermatozoa. *Acta histochem.*, 78: 197-215, 1986.

- SUMMERHILL, W.R. & OLDS, D. Levels of deoxyribonucleic acid in bovine espermatozoa and their relationship to fertility. *J. Dai. Sci.*, 44: 548-551, 1961.
- VALE FILHO, V.R.; PINTO, P.A.; FONSECA, J. & SOARES, L.C. O.V. *Patologia do sêmen, diagnóstico andrológico e classificação de Bos taurus e Bos indicus quanto à fertilidade, para uso como reprodutores, em condições de Brasil. De um estudo em 1.088 touros. Dow Prize for 1978. Dow Química S.A., São Paulo, 1-54, 1978.*
- WELCH, R.M. & RASCH, L. The deoxyribonucleic acid (DNA) content of semen spermatozoa and testis germinal cells from Santa Gertrudis bull of known fertility and infertility. In: *Studies in genetics*. Edited by M.R.WHEELER, University of Texas Publication No. 6014, Austrin, Texas: 31-37, 1960.
- WURSTER, D.H. & BENIRSCHKE, K. Chromosome studies in the superfamily bovoidea. *Chromosoma*, 25: 152-171, 1968.