



Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC
Curso de Medicina Veterinária
Trabalho de Conclusão de Curso

Monitoramento da qualidade do sêmen, das espécies bovina e ovina, estocado nos últimos 50 anos no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal da EMBRAPA

Gama-DF
2023

LHORRANNY DE CASTRO COSTA

Monitoramento da qualidade do sêmen, das espécies bovina e ovina, estocado nos últimos 50 anos no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal da EMBRAPA

Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariane Leão Freitas.

Gama-DF

LHORRANNY DE CASTRO COSTA

Monitoramento da qualidade do sêmen, das espécies bovina e ovina, estocado nos últimos 50 anos no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal da EMBRAPA

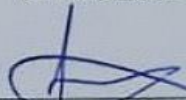
Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.

Gama-DF, 29 de Novembro de 2023.

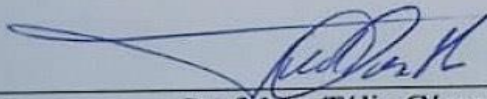
Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Mariane Leão Freitas.
Orientadora



Prof. Me. Luís Fernando de Oliveira Varanda
Examinador



Prof. Me. Túlio César Neves
Examinador

Monitoramento da qualidade do sêmen das espécies bovina e ovina estocado nos últimos 50 anos no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal da EMBRAPA

Lhorranny de Castro Costa¹
Mariane Leão Freitas²

Resumo:

O presente trabalho tem como objetivo a realização de análises computadorizadas de amostras de sêmen de touros e carneiros de diferentes raças e partidas estocados no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA). As palhetas foram descongeladas e avaliadas por meio de microscopia computadorizada (CASA; Hamilton Thorne, Ivos II), visando análise da cinética espermática, com os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, velocidade curvilinear, velocidade média de percurso e velocidade média em linha reta. Os resultados das avaliações foram catalogados em planilhas e submetidos a análise estatística descritiva por meio do software Excel e teste de Tukey-Kramer. Com os produtos foi possível elaborar tabelas relatando as diferenças estatísticas visualizadas nos testes e fazer comparativos. Das 5 raças analisadas de bovinos 1 apresentou qualidade inferior à estabelecida para sêmen congelado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) e das 3 raças de ovinos analisadas 1 apresentou qualidade inferior à estabelecida pelo CBRA. Tais resultados são relevantes para que haja a manutenção da qualidade do sêmen estocado no BBGA.

Palavras-chave: análise computadorizada; touro; carneiro; criopreservação.

Abstract:

The present work aims to carry out computerized analyzes of semen samples from bulls and rams of different breeds and batches stored at the Brazilian Animal Germplasm Bank (BAGB). The straws were thawed and evaluated by means of computerized microscopy (CASA; Hamilton Thorne, Ivos II), aiming at the analysis of sperm kinetics, with the parameters total motility,

¹Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. E-mail: lhorrannycosta@gmail.com.

² Docente do Curso de Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. E-mail: mariane.freitas@uniceplac.edu.br.

progressive motility, curvilinear velocity, average velocity in the path and average speed in a straight line. The evaluation results were cataloged in spreadsheets and submitted to descriptive statistical analysis using Excel software and Tukey-Kramer test. With the products it was possible to create tables reporting the statistical differences seen in the tests and make comparisons.

Of the 5 cattle breeds analyzed, 1 presented lower quality than that established for frozen semen by the Brazilian College of Animal Reproduction (BCAR) and of the 3 sheep breeds analyzed, 1 presented lower quality than that established by the BCAR. Such results are relevant for maintaining the quality of the semen stored in the BAGB.

Keywords: computerized analysis; bull; ram; cryopreservation.

1 INTRODUÇÃO

Os Bancos de Germoplasma constituem uma alternativa acessível e muito importante na preservação do germoplasma das espécies primitivas. Pela criopreservação de sêmen e embriões poderá, no futuro, restaurar comunidades que por algum motivo possam ter sido extintas e que possuam características importantes para a pecuária nacional. Nestes conjuntos pode ser encontrada a diversidade necessária e características de adaptação às mudanças na natureza que possuem como objetivo aumentar a produção ou agregar genes de interesse econômico às raças comerciais (HIEMSTRA et al., 2005).

No que se refere às raças nativas de importância conservacionista está a raça Pantaneira, descendente de bovinos de origem espanhola que vieram nas expedições que ocorreram na Bacia do Prata. Esta foi influenciada, indiretamente, por raças portuguesas através de raças já naturais como o Fanqueiro e o Curraleiro (Mazza et al., 1994). A raça Crioulo Lageano, se parece com a raça Berrenda da Andaluzia (Primo, 2000). Já a raça Mocho Nacional (MN) difere da raça Caracu pela ausência de chifre (Santiago, 1985 apud Rosa, 1992).

Segundo Primo (2000), o surgimento dos ovinos naturalizados levanta controvérsias no Brasil. A ovelha Crioula Lanada indica ter descendência na raça espanhola Churra ou na raça portuguesa Churra Bordaleira (Vaz, 1993; Primo, 2000). Já as raças que não possuem lã, como por exemplo, Morada Nova e Santa Inês, podem ter se originado da África, podendo ter adentrado no Brasil nos séculos XVII e XVIII, na época da escravatura (Primo, 1999).

No decorrer dos últimos anos, a Embrapa tem coletado sêmen e embriões de bovinos de raças oriundas de determinadas regiões brasileiras, e que apresentam risco de serem extintas, e guardado esse material no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA). Este importante material genético poderá ser utilizado para recuperar uma raça extinta, e promover o desenvolvimento de um novo grupo genético, prestar auxílio a programas de conservação *in vivo* e para estudos que identificam genes de importância econômica (FAO, 1998).

Para diminuir a subjetividade nas análises ópticas, o sistema de análise computadorizada de sêmen (CASA) vem sendo utilizado, para que seja oferecido maior confiança e velocidade na obtenção dos resultados, mas seu uso ainda é limitado devido ao seu custo, e diferentes configurações entre pesquisadores, que podem gerar diferentes resultados (MATOS et al., 2008).

Segundo Amann e Katz (2004), o CASA se trata de um sistema computadorizado (Hardware e Software) para visualizar e digitalizar imagens subsequentes dos espermatozoides, processando, analisando e oferecendo informações aperfeiçoadas, precisas e consideráveis da cinética de cada célula, e valores de estatística.

Tem-se, portanto, que os avanços nos testes laboratoriais têm tido grande utilidade para excluir amostras de sêmen de animais com baixa eficiência reprodutiva, contudo, se tem como desafio mostrar, dentre os animais viáveis, quais os mais adequados para ofertar as maiores taxas de prenhez (ARRUDA et al., 2010b).

O presente trabalho tem como objetivo a realização de análises computadorizadas de amostras de sêmen de touros e carneiros de diferentes raças e partidas estocados no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), e identificação de partidas de sêmen que apresentam qualidade inferior à estabelecida para sêmen congelado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, para que haja a manutenção da qualidade do sêmen estocado no BBGA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Recursos Genéticos e Biotecnologia, com sede em Brasília-DF, entre os anos de 2022 e 2023.

Noventa e quatro doses de sêmen bovino das raças: Junqueira (n=7), Nelore (n=51), Pantaneiro (n=23), Crioulo Lageano (n=6), Mocho Nacional (n=7) e trinta e sete doses de sêmen de ovino das raças: Morada Nova (n=24), Santa Inês (n=7), Crioulo Lanado (n=6), foram estocadas nos últimos 50 anos em botijões criogênicos de nitrogênio líquido a -196°C no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. As palhetas congeladas de sêmen bovino eram de 0,5 ml, enquanto as de ovino eram de 0,25 ml. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e submetidas à análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne, Ivos II, Beverly, MA, USA).

Para a cinética dos espermatozoides, 3 μL de sêmen descongelado e diluído em solução de PBS/XCEL, numa proporção média de sêmen:solução de 1:2 para a espécie bovina e 1:10 para a espécie ovina, foram colocados em uma lâmina de leitura (Leja® standard count, SC20. 01.04. B, 20 microns), e foi ajustado no CASA o “setup” para espécie bovina e para a espécie ovina. Em

seguida, foram avaliados os parâmetros: motilidade progressiva (MP,%) e total (MT,%), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média de percurso (VAP $\mu\text{m/s}$) e velocidade média em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$) e concentração de espermatozoides (10^6 /ml).

Após as análises realizadas pelo CASA, os dados obtidos foram tabelados de acordo com a espécie, comparando os parâmetros avaliados entre as raças analisadas. Foi realizada análise estatística, com os resultados apresentados em média e desvio padrão, de cada grupo, com auxílio do software Excel e teste de Tukey-Kramer.

3 RESULTADOS

Os dados da avaliação de sêmen feita pelo CASA para as raças bovinas estão apresentados na Tabela 1. O sêmen da raça Pantaneira $21,8 \pm 14,5\%$ (média \pm desvio padrão) ficou abaixo do esperado (30%), no que se refere a motilidade total, de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). As raças Junqueira, Nelore, Crioulo Lageano e Mocho Nacional não apresentaram diferenças entre elas, e ficaram dentro do considerado como adequado para o sêmen descongelado, de acordo com o CBRA (2013) para a MT.

Tabela 1 – Qualidade do sêmen de bovinos das raças Junqueira, Pantaneiro, Nelore, Crioulo Lageano e Mocho Nacional, conservados no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal nos últimos 50 anos, após descongelamento e avaliação realizada por sistema automático de análise seminal (CASA). Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

| Raça | Junqueira | Nelore | Pantaneiro | Crioulo Lageano | Mocho Nacional |
|------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| N | 7 | 51 | 23 | 6 | 7 |
| Motilidade Total | $30,7 \pm 10,7^{ab}$ | $47,4 \pm 14,8^a$ | $21,8 \pm 14,5^b$ | $49,7 \pm 8,5^a$ | $37 \pm 22,5^{ab}$ |
| Motilidade Progressiva | $15,5 \pm 7,6^a$ | $30,3 \pm 11,2^b$ | $10,4 \pm 7,5^b$ | $17,4 \pm 3,8^b$ | $13,4 \pm 9,9^b$ |
| VCL | $200,5 \pm 19,4^a$ | $190,6 \pm 34,4^a$ | $161,4 \pm 47^{ab}$ | $133,8 \pm 18,3^b$ | $145,3 \pm 51,1^{ab}$ |
| VSL | $76,9 \pm 10,4^{ab}$ | $88,5 \pm 14,1^a$ | $71 \pm 21,3^b$ | $56,5 \pm 10,9^b$ | $53,7 \pm 18,3^b$ |

| | | | | | |
|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| VAP | 103,4 ± 11,3 ^{ab} | 107 ± 15 ^a | 89,5 ± 24,4 ^{bc} | 73,7 ± 9,2 ^c | 73,8 ± 23,7 ^c |
| Concentração | 95,1 ± 29,7 ^{ab} | 104,7 ± 41,7 ^{ab} | 156,1 ± 83,3 ^a | 68,4 ± 21,0 ^b | 162,9 ± 43,8 ^a |

^{abc}Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Os dados da avaliação de sêmen feita pelo CASA para as raças ovinas estão apresentados na Tabela 2. O sêmen da Morada Nova $20,7 \pm 12,4$ (média ± desvio padrão) ficou abaixo do esperado (30%), no que se refere à motilidade total, de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). As raças Santa Inês e Crioulo Lanado não apresentaram diferenças entre elas, e ficaram dentro do considerado como adequado para o sêmen descongelado, de acordo com o CBRA (2013) para a MT.

Tabela 2 – Qualidade do sêmen de ovinos das raças Morada Nova, Santa Inês e Crioulo Lanado, conservados no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal nos últimos 50 anos, após descongelamento e avaliação realizada por sistema automático de análise seminal (CASA). Dados apresentados em média ± desvio padrão.

| Raça | Morada Nova | Santa Inês | Crioulo Lanado |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| N | 24 | 7 | 6 |
| Motilidade Total | 20,7 ± 12,4 | 33,6 ± 14,8 | 32,8 ± 13,8 |
| Motilidade Progressiva | 11,3 ± 8,2 | 15,4 ± 7,7 | 15,6 ± 13,7 |
| VCL | 165,7 ± 34,4 ^b | 232,3 ± 52,1 ^a | 127,6 ± 62,6 ^b |
| VSL | 80,7 ± 18,8 | 76,5 ± 20,6 | 63,1 ± 34,9 |
| VAP | 98,1 ± 17,4 | 106,8 ± 26,6 | 77,3 ± 37,2 |
| Concentração | 602,9 ± 382,2 | 307,8 ± 90,6 | 637,4 ± 256 |

^{ab}Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($P < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Das raças avaliadas no presente experimento apenas o sêmen da raça Pantaneira na espécie bovina e o sêmen da raça Morada Nova na espécie ovina apresentaram parâmetros de cinética espermática abaixo do considerado pelo CBRA. A avaliação de sêmen estocado em bancos de germoplasma, é de suma importância, para que se avalie a probabilidade de se obter um resultado satisfatório, em caso de necessidade da utilização da genética armazenada. Mesmo apresentando parâmetros abaixo do esperado, não se deve descartar o material genético de animais que estão em conservação, como no caso da raça Pantaneira e da raça Morada Nova, do presente trabalho. Ter consciência sobre a qualidade do sêmen preservado auxilia na tomada de decisões sobre a melhor forma de aplicação desse sêmen na reprodução assistida, inclusive podendo-se considerar técnicas mais avançadas da reprodução em caso de necessidade de recuperação da genética dos animais.

Sabe-se que os resultados de avaliações de sêmen dependem de variáveis fatores, como a individualidade da raça/espécie e do animal na composição do seu sêmen e estrutura molecular dos espermatozoides, técnica de criopreservação utilizada, o meio de diluição do sêmen, a temperatura das curvas de congelamento. Um sêmen que tenha sido armazenado há muito tempo, pode ter tido protocolo diferente dos utilizados na atualidade, com diluentes que não eram padronizados comercialmente, o que pode levar a uma variação no resultado observado.

Do sêmen bovino avaliado no presente trabalho, 51 amostras eram da raça nelore. Essa raça não está em processo de conservação, como as outras raças avaliadas, pois é comercialmente muito utilizada, mas auxilia a verificar se o sêmen criopreservado no BBGA, está em condições semelhantes ao proposto pela literatura para essa raça. No atual experimento, foi verificado uma média de 47,4% de motilidade total para o sêmen da raça nelore avaliada, o que está abaixo do encontrado por Fonseca et al. (2019) para animais da mesma raça com faixas etárias diferentes, onde animais que apresentavam entre 12 a 18 meses de vida tiveram em média uma MT de 67,73% e animais entre 48 e 80 meses de vida apresentaram em média uma MT de 71,54%.

No que se refere a raça de conservação, Pantaneira, foram avaliadas 23 amostras e foi verificado uma média de 21,8% de motilidade, o que está abaixo do encontrado por Senra et al. (2017) para animais da mesma raça submetidos a diferentes estações do ano, no qual foi observada uma MT média que variou entre 32% no inverno e 34,2% no verão.

A raça Morada Nova, também da conservação, apresentou motilidade média de 20,7%, em 24 amostras avaliadas, esse valor está abaixo quando comparado ao estudo de Bezerra (2017), no qual animais da mesma raça foram submetidos a diferentes climas, no qual foi observada uma MT média que variou entre 29, 3% na época chuvosa e 33,3% na época seca

É enfatizado que espermatozoides imóveis são incapazes de fertilizar, entretanto, dentre os espermatozoides móveis, pode existir células incapazes de fertilizar também, pois podem apresentar elevada motilidade espermática após o descongelamento e não serem férteis em decorrência de danos estruturais, como no acrossoma, por exemplo.

No que se refere a concentração de espermatozoides por ml de sêmen congelado, as raças bovinas avaliadas tiveram suas concentrações entre 68,4 - 162,9 x 10⁶/ml, tais resultados ultrapassaram os limites preconizados por Amann (1989) que relatou que para avaliação computadorizada da cinética seminal, o sêmen de touro criopreservado deve ser diluído de 10–12 x 10⁶/ml a 40–60 x 10⁶/ml.

Já em ovinos, as raças avaliadas tiveram suas concentrações entre 307,8 - 637,4 x 10⁶/ml, a raça Santa Inês ficou abaixo do valor preconizados por Lima et al (2019) onde recomendou-se a concentração de 600 x 10⁶/ml para preservação das características espermáticas após o processo de congelamento. As demais raças se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos para a espécie.

Essa diferença encontrada entre o estudo de Fonseca et al. (2019), Senra et al. (2017), e Bezerra (2017), no que trata sobre motilidade, e entre os estudos de Amann (1989) e Lima et al (2019), tratando sobre concentração, e o presente trabalho pode ter ocorrido pelo tempo de armazenamento do sêmen, considerando que o presente estudo avaliou sêmen congelado dos últimos 50 anos que estavam no BBGA, assim, possivelmente tendo sido utilizados diferentes protocolos e diluentes empregados no sêmen armazenado no BBGA.

Outro ponto que pode ser observado é que a elevada concentração do sêmen bovino pode exercer influencia com sua qualidade, pois o diluente pode não conseguir abranger todos os espermatozoides numa única palheta, levando a possíveis lesões no processo de criopreservação.

No que tange aos parâmetros de velocidade (VAP, VSL, VCL), ainda não há na literatura uma definição de ideal categórico, contudo, segundo autores como Mortimer (2000), entre estes parâmetros de velocidade, VCL é sempre o mais alto dos três valores, enquanto VSL é o mais baixo, tais características são observadas nos resultados deste trabalho, comprovando tal afirmação.

Outro ponto a ser observado é que, segundo Rijsselaere et al. (2003), os diluentes interferem nos valores das velocidades, medidas de velocidade como VAP e VCL apresentam-se mais baixas quando utilizado o diluente tris-gema de ovo, isso pode ser associado à maior viscosidade do diluente, levando os espermatozoides desacelerarem.

No presente trabalho não se sabe os diluentes utilizados, contudo é importante observar que o efeito do diluente interfere na motilidade dos espermatozoides, e isso precisa ser claramente entendido antes de se construir interpretações sobre os resultados do CASA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os dados desse trabalho, é possível afirmar que de acordo com os parâmetros propostos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, o sêmen de bovinos e ovinos armazenado criopreservado no BBGA se encontram dentro de um padrão esperado para a avaliação após o descongelamento, com exceção das raça Pantaneira e Morada Nova que apresentaram motilidade total abaixo do que seria considerado viável.

Enfatizando que, entre todos os parâmetros observados, a motilidade é uma das características mais importantes que está associada com a capacidade de fertilização dos espermatozoides, ela ainda é o parâmetro de escolha para determinar o nível de dano espermático oriundo do processo de criopreservação.

Por conseguinte, foi mostrado a importância de se haver um controle e manutenção da qualidade do gamoplasma animal inseridos nos Bancos, pois o regate de populações extintas ou em risco de extinção depende da capacidade de fertilização dos materiais armazenados.

Por fim, sabendo que Brasil possui uma grande biodiversidade genética não só de bovinos, mas também de ovinos espalhadas por propriedades que não possuem acesso às recentes tecnologias disponíveis no mercado, seria necessário maior atenção às pequenas propriedades, para que o material desses animais também pudesse se encontrar inseridos nos bancos genéticos, já que representam importância produtiva, e de conservação, de interesse nacional.

REFERÊNCIAS

AMANN, RUPERT P. **O potencial de fertilidade de uma amostra seminal pode ser previsto com precisão ?** J Androl 10 , 89-98, 1989.

AMANN, RUPERT P.; KATZ, DAVID F. **Andrology lab corner*: Reflections on casa after 25 years**. Journal of andrology, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

ARRUDA, R. L., ORRO, I. R., PASSOS, T. S., COSTA E SILVA, E. V., & ZÚCCARI, C. E. S. N. **Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros**. Rev. Bras. Reprod. Anim, 34(3), 168-184 , 2010.

BEZERRA, PALOMA ELEUTÉRIO. **Viabilidade do sêmen de ovinos Morada Nova branca conservado em tris-gema nas épocas seca e chuvosa**. 2017.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª Ed.; Belo Horizonte: CBRA, 2013.

DAVIS RO, KATZ DF. **Operational standards for CASA instruments**. J Androl, v.14, p.385-395, 1993.

FARRELL, PB, FOOTE, RH, McARDLE, MM, TROUERN-TREND, VL, & TARDIF, AL. **Procedimentos de meio e diluição testados para minimizar os efeitos do manuseio em espermatozoides humanos, de coelhos e de touros para análise de espermatozoides assistida por computador (CASA)**. Revista de Andrologia , 17 (3), 293-300, 1996.

FAO. **Secondary guidelines for development of national farm animals genetics resources management plans**: Management of small population at risk. 210 p.,1998.

FONSECA, V. O., VALE FILHO, V. R., CHOW, L. A., BERGMANN, J. A., & ASSUMPCÃO, T. I. **Efeito da concentração espermática sobre a taxa de gestação de vacas zebus (Bos taurus indicus)**. Arq. bras. med. vet. zootec, 687-97, 1995.

FONSECA, V.O; SOUZA, C.F; AZEVEDO, N.A.; OLIVEIRA, L.Z.; MONTEIRO, G.A.; CAVALCANTI, L.F.L.; MOLINA, L.R. **Parâmetros reprodutivos de touros Nelore (Bos taurus indicus) criados a pasto, em de diferentes faixas etárias**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.71, n.2, p.385-392, 2019.

HIEMSTRA, S. J., LENDE, T., & WOELDERS, H. **The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies.** In **The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources.** International Workshop, Turin, Italy, 5-7 March 2005 (pp. 1-12). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2005.

LIMA, F. R. G., DE ARAUJO, A. A., SANTOS, D. O., FACÓ, O., CATUNDA, A. G. V., LIMA, Í. C. S., & LINARD, M. A. B. **Efeito da concentração espermática sobre sêmen congelado de carneiros da raça santa inês,** 2019.

MATOS, D. L., ARAÚJO, A. A., ROBERTO, I. G., & TONIOLLI, R. **Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 32(4), 225-232, 2008.

MAZZA, M.C.M., et al. **Etnobiologia e conservação do bovino Pantaneiro.** EMBRAP-CPAP - Corumbá. 61 p, 1994.

MORTIMER ST. **Casa- Practical aspects.** J Androl, p.515-524, 2000.

PRIMO, A.T. **Introdução de animais domésticos no Novo Mundo.** In: II Simpósio de recursos genéticos para América Latina e Caribe - SIRGEALC., Anais..., Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CD-ROOM. CD.25, 1999.

PRIMO, A.T. **The discovery of Brazil and the introduction of domestic animals.** In: V Global Conference on Conservation of Domestic Animal Genetic Resource, 2000, Brasília. Proceedings... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CD-ROM. CD59, 2000.

RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., MAES, D., & DE KRUIF, A. **Efeito das configurações técnicas nos parâmetros de motilidade do sêmen canino medidos pelo analisador Hamilton-Thorne.** Teriogenologia , 60 (8), 1553-1568, 2003.

ROSA, A.N., L.O.C. SILVA Y J.C.A. **Raças mochas: História e genética.** Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC. 64 p. (EmbrapaCNPGC. Documentos, 50), 1992.

SENRA, L. E., HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K., RAMOS, A. F., ZERVOUDAKIS, J. T., TSUNEDA, P. P., JUNIOR, M. F. D., ... & DE OLIVEIRA MORAES, J. **Sazonalidade e qualidade do sêmen fresco e criopreservado de touros Pantaneiro e Nelore.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 24(2), 2017.

VAZ, C.M.S.L. **Situação atual da preservação e avaliação de ovinos crioulos lanados no Brasil.** In: 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais... Rio de Janeiro. p. 207-215, 1993.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, o grande arquiteto do universo, agradeço por tudo.

Á minha mãe Elivoni Ferreira, que sempre forneceu apoio e motivação ao longo dessa jornada, e ao meu irmão João Carlos Filho, que sempre apoiou meus sonhos e me ajudou a torna-los realidade. A vocês meu respeito e amor incondicional.

Ao meu querido pai João Carlos (*in memoriam*) que tenho certeza que estaria orgulhoso de onde eu cheguei. Uma homenagem.

Aos doutores Alexandre Floriani e Paula Lorena por toda paciência e solicitude, seus ensinamentos foram fundamentais para a realização desse experimento. O meu apreço.

Aos meus professores, em especial à minha orientadora Dr^a Mariane Leão pela confiança ao me indicar para este projeto, sem você nada disso seria possível. A minha gratidão.

Aos meus amigos Elza Moreira, Evaldo Rodrigues e Núbia Pereira, por todo incentivo e ajuda, vocês desempenharam um papel significativo no meu desenvolvimento durante este curso. O meu carinho.

A vocês dedico.