



Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade

Bull sperm morphology: interpretation and impact on fertility

Rubens Paes de Arruda^{1,5}, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹, Alexandre Rossetto Garcia², Gabriel De Carli dos Santos¹, Ticiano Guimarães Leite¹, Letícia Zoccolaro Oliveira^{1,3}, Renata Lançoni¹, Mariana de Paula Rodrigues⁴

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

²Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴Universidad Técnica de Comercialización y Desarrollo, Facultad de Medicina Veterinaria, Asunción, Paraguay.

⁵Correspondência: arrudarp@usp.br

Resumo

Embora nas últimas décadas tenham sido desenvolvidas diversas técnicas laboratoriais que aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides, o estudo e aplicação das alterações da forma espermática (patologia espermática) continuam sendo componentes essenciais para o exame do sêmen, pois fornecem uma estimativa do percentual de espermatozoides normais ou estruturalmente íntegros, assim como a distribuição dos diferentes defeitos morfológicos. Neste trabalho são apresentados, entre outros, os aspectos de técnicas utilizadas para a avaliação e classificação da morfologia espermática. Ainda, quanto à morfologia espermática, discutiu-se a origem, interpretação e impacto na fertilidade. Por fim, foram apresentados os padrões normalmente utilizados para a avaliação do potencial de fertilidade do sêmen bovino congelado de forma convencional e sexado.

Palavras-chave: andrologia, avaliação seminal, espermatozoide, fertilidade, morfologia.

Abstract

Although in recent decades it has been developed various laboratory techniques that increased the possibility of a more detailed analysis of the structural integrity of sperm, the study and application of changes in the sperm morphology (sperm pathology) continue to be essential components for the semen examination, it gives an estimative of the percentage of normal sperm or structural integrity, as well as the distribution of different morphological defects. This work presents, among others, aspects of techniques used for the assessment and classification of sperm morphology. Moreover, regarding the sperm morphology, the origin, interpretation and impact on fertility were discussed. Finally, some patterns used for assessing the potential fertility of cryopreserved bovine semen (conventional and sexed) are presented.

Keywords: andrology, fertility, morphology, semen evaluation, sperm.

Introdução

A morfologia espermática pode ser descrita como o estudo anatômico do gameta masculino, ou seja, da célula espermática. Os Centros de Processamento e Comercialização de Sêmen (também conhecidos como “Centrais de Inseminação Artificial”) usam a morfologia espermática como parte do controle de qualidade para decidir o destino do ejaculado. É muito importante pensar que todo espermatozoide que chega à tuba uterina, realiza a fertilização do óocito e induz o desenvolvimento embrionário com sucesso, tem que realizar de forma perfeita muitas funções e, com isso, superar uma série de obstáculos impostos pelo trato reprodutivo feminino. Isto implica que, durante a formação no testículo (espermatogênese) e sua passagem e maturação pelo epidídimo, o espermatozoide não incorreu em qualquer alteração morfológica, metabólica, imunológica ou genética. Tendo em conta que o espermatozoide é uma célula altamente diferenciada, isto significa que cada compartimento celular deve não só estar intacto, mas também deve responder adequadamente a sinais intra e extracelulares. Assumindo que um espermatozoide possui este nível de perfeição e é capaz de atingir e penetrar um óocito, ele só pode ser considerado como “fértil”, ou “viável”, se o DNA transportado estiver intacto e capaz de sustentar o desenvolvimento embrionário (adaptado de Holt, 2009).

Sabe-se que a espermatogênese é um evento extremamente delicado e que qualquer fator capaz de alterar esse processo resulta na produção de espermatozoides anormais (Garcia, 2004). Observações de que alterações morfológicas dos espermatozoides estavam associadas com baixa fertilidade em touros foram publicadas no início do século 20 e a avaliação da morfologia espermática sob microscopia óptica, desde então,



vem constituindo uma parte importante para a investigação da baixa fertilidade em touros (Williams, 1920; Williams e Savage, 1925; Lagerlöf, 1934, 1936). Williams e Savage (1927) fizeram uma primeira tentativa para determinar a quantidade mínima de espermatozoides morfológicamente normais que o ejaculado de um touro deveria ter a fim de apresentar bom potencial para a fertilidade.

Como citado por Nöthling e Irons (2008), vários estudos mostraram que alterações morfológicas podem ter origem durante as diferentes fases de vida do espermatozoide, dentre elas a espermatogênese (Zerobin e Bertschinger, 1978), espermiogênese (Williams e Savage, 1925; Blom e Birch-Andersen 1970), transporte e armazenamento epididimários (Blom, 1950a; Swanson e Boyd, 1962; Van Rensburg et al., 1966), retenção espermática nas ampolas (Nöthling e Volkmann, 1997), ejaculação (Bialy e Smith, 1958) ou após a ejaculação (Lagerlöf, 1936). Em revisão de grande complexidade, Barth e Oko (1989) forneceram informações que mostraram que o tipo de defeito morfológico observado no ejaculado quase sempre indica a origem do mesmo. Mudanças da morfologia espermática podem indicar leve a grave alteração do epitélio seminífero. Dentre estas, podem-se citar a divisão nuclear irregular durante a meiose, transformação anormal do núcleo, vesícula de Golgi, centríolo, mitocôndrias das espermátides durante a espermiogênese, falha de migração da gota citoplasmática durante a maturação epididimária, incapacidade de manter a coerência flagelar durante a migração no epidídimo, deterioração da estabilidade da membrana durante o armazenamento no epidídimo e desintegração de espermatozoides senescentes no epidídimo ou ampola. Após a ejaculação ou descongelamento, se os espermatozoides forem expostos a ambiente hipotônico ou ao frio, há indução de dobras nas caudas, enquanto manipulações bruscas podem causar o destacamento das cabeças (Lagerlöf, 1936) ou fraturas das caudas. Por outro lado, a incubação *in vitro* ou os processos de congelamento e descongelamento podem causar flexão das caudas e mudanças acrossomais (Nöthling e Irons, 2008).

Embora nas últimas décadas tenham surgido sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens, métodos de “coloração” empregando sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, que aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides, o estudo e aplicação das alterações da forma espermática (“patologia espermática”) continuam sendo componentes essenciais para o exame do sêmen, pois fornece uma estimativa do percentual de espermatozoides normais ou estruturalmente íntegros, assim como a distribuição dos diferentes defeitos morfológicos (Arruda et al., 2011).

Espermatogênese e função do epidídimo

Para o entendimento de possíveis alterações morfológicas dos espermatozoides que ocorrem no testículo e no epidídimo, é necessário o domínio dos conhecimentos relacionados à espermatogênese e à maturação espermática, respectivamente (Johnson et al., 2000).

Resumidamente, a espermatogênese é a soma total dos eventos que ocorrem nos testículos que levam à produção de espermatozoides (Johnson et al., 2000), ou seja, constitui-se em uma série de divisões celulares sucessivas que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos e que transformam uma célula germinativa diploide em um gameta masculino haploide (Kudryavtsev et al., 2003). Cada estágio do desenvolvimento pode ser observado no epitélio seminífero, de modo que as células menos diferenciadas estão localizadas próximas à lâmina basal do epitélio seminífero e conforme vão passando por divisões e transformações migram do compartimento basal para o adluminal, atravessando a barreira hemato-testicular até a espermição na luz do túbulo seminífero (Mruk e Cheng, 2004).

A espermatogênese em bovinos é um processo com duração média de 60 dias. Ela pode ser dividida em três fases: 1) Espermatocitogênese - caracterizada divisões mitóticas; envolve a divisão mitótica das células germinativas para a produção de células tronco germinativas e espermatócitos primários; 2) Meiose - que envolve a duplicação dos cromossomos, cuja função é a recombinação e segregação do material genético; 3) Espermiogênese - nesta fase, a espermátide sofre alterações morfológicas, diferenciando-se em espermatozoide, (Russell et al., 1990; Johnson et al., 2000; Leite, 2008).

Devido ao seu caráter cíclico, os vários tipos celulares presentes no interior de uma seção perpendicular do epitélio seminífero formam associações celulares bem definidas. Doze associações ou estágios celulares distintos são identificáveis no epitélio seminífero do touro. Um ciclo completo de estágios, conhecido como “ciclo do epitélio seminífero” é dependente do tempo e pode ser definido como “uma série de modificações entre duas aparições de associação celular ou de estágios de desenvolvimento em determinada área do epitélio seminífero”. A duração de um ciclo do epitélio seminífero é mais ou menos 14 dias. São necessários de 4 a 5 ciclos epiteliais para que uma célula-tronco do primeiro ciclo (espermatogônia Tipo A) complete a metamorfose da espermiogênese (Garner e Hafez, 2004).

No epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, existem duas populações de espermatogônias (células germinativas pouco diferenciadas): as espermatogônias Tipo A e as espermatogônias Tipo B. As espermatogônias Tipo A constituem uma população de reserva, cujas células são extremamente resistentes à radiação e injúrias tóxicas. A população de espermatogônias Tipo B é uma população proliferativa, cujas células são capazes de se dividir para formar espermatócitos primários (Johnston et al., 2001). A espermatocitogênese

envolve a divisão mitótica das espermatogônias A1 em células mais diferenciadas, denominadas espermatogônias A2, A3, intermediárias, B1 e B2. Estas últimas se dividem para originar dois espermatócitos primários, que entram em meiose para formar os espermatócitos secundários, que ao final da segunda meiose originam as espermátides (Amann e Schanbacher, 1983). Do ponto de vista de variabilidade genética, a fase inicial da meiose (chamada de prófase) é crucial, pois é durante a mesma que ocorre a recombinação gênica. Todo o processo de espermatocitogênese divisional, desde a espermatogônia até espermátide, leva aproximadamente 45 dias no touro (Garner e Hafez, 2004). Na espermiogênese, as espermátides se diferenciam para originar os espermatozoides (Amann e Schanbacher, 1983). As espermátides já são células haploides; neste estágio de desenvolvimento não ocorre mais nenhuma divisão celular e cada espermátide inicia sua transformação em um espermatozoide (Johanisson et al., 2000).

Os espermatozoides formados pela diferenciação das espermátides ainda não possuem poder de fecundação. São liberados gradativamente dos túbulos seminíferos para os túbulos retos, alcançam a *rete testis* e chegam ao epidídimo, onde adquirem mobilidade própria e capacidade fecundante como parte de seu processo de maturação. Durante a espermatogênese, a degeneração aleatória de uma célula em particular pode acontecer a qualquer momento, sem comprometer as outras células que permanecem em divisão ou transformação. Estudos mostram que cerca de 25% das células germinativas normalmente se degeneram durante o transcorrer da espermatogênese (Greep, 1976).

Degeneração e morte das células germinativas masculinas pode ocorrer em qualquer fase da espermatogênese e é atribuída a distúrbios intrínsecos ou adquiridas da viabilidade celular, resultando em apoptose (Aitken et al., 2011). A apoptose está envolvida na remoção de células germinais que são danificadas como resultado de exposição a agentes tóxicos ambientais, agentes quimioterapêuticos ou calor (Wang et al., 2007). Um papel da apoptose na infertilidade masculina tem sido sugerido em virtude do número elevado de células germinativas apoptóticas observados nos testículos de alguns homens inférteis, bem como da presença de marcadores de apoptose, incluindo a ativação da caspase e exteriorização da fosfatidilserina em espermatozoides de pacientes inférteis (Aitken et al., 2011). A apoptose é a maior causa de danos ao DNA espermático, tanto antes como após a espermatogênese (Dogan et al., 2013).

Os espermatozoides “maduros” são transportados e armazenados na cauda do epidídimo e, embora o ambiente epididimário seja favorável a sua sobrevivência, estes não são preservados indefinidamente. No touro, o tempo despendido para o transporte dos espermatozoides pelo epidídimo é de cerca de sete dias. Contudo, este transporte depende de contrações que ocorrem na parede do ducto deferente, cerca de três vezes por minuto. Importante notar que o tempo de trânsito pode ser reduzido de 10 a 20%, pelo aumento da frequência da ejaculação (Garner e Hafez, 2004).

No segmento inicial do epidídimo ocorre uma concentração do fluido oriundo do testículo e o primeiro estágio da maturação espermática. A maturação é completada no segmento médio e os espermatozoides são então armazenados no segmento terminal (Amann e Schanbacher, 1983).

Técnicas utilizadas para a avaliação da morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática pode ser realizada por diferentes técnicas laboratoriais. Freneau et al. (2010) compararam a morfologia espermática dos ejaculados dos mesmos touros com duas técnicas: câmara úmida sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e esfregaço corado com eosina-nigrosina sob microscopia óptica de campo claro. Esses autores verificaram diferenças significativas entre técnicas quanto ao diagnóstico dos defeitos maiores e menores, porém não sobre os defeitos totais. Os defeitos de forma de cabeça não apresentaram diferenças. A técnica da câmara úmida detectou uma frequência maior em todos os tipos de defeitos de acrossoma, crateras, *pouch formation* e vacúolos e gotas citoplasmáticas. Por outro lado, a análise seminal em esfregaços com lâminas coradas apresentou maior frequência nos defeitos de cauda e cabeça isolada normal. Foram observadas diferenças não somente entre médias, como também na frequência de touros que apresentaram as diferentes patologias espermáticas nos ejaculados. Neste sentido, foram agrupados em defeitos que eram favorecidos pela qualidade óptica ou provocados por interferência da técnica, e estes foram influenciados pelas metodologias empregadas (Freneau et al., 2010). Portanto, é de extrema importância a escolha da técnica a ser empregada, devido ao fato de que o esfregaço de lâmina corada pode apresentar resultados insatisfatórios.

Classificação da morfologia espermática

Em consideração a publicação de Casagrande et al. (1979), a classificação das anormalidades espermáticas dos ejaculados dividida em três grupos foi proposta por Blom (1950a). No primeiro grupo, denominado de “Anomalias espermáticas primárias”, o autor reuniu aquelas anomalias que apresentam suas origens devido à desordem do epitélio seminífero (formas anormais de cabeça, anomalias de desenvolvimento de acrossomo e certas anomalias de peça intermediária e da cauda), verificando que mais de 15% destas anomalias eram encontradas em touros de fertilidade prejudicada. No segundo grupo, denominado de “Anomalias



espermáticas secundárias”, foram incluídas aquelas formas que aparecem no espermatozoide como resultado de condições não fisiológicas, possivelmente ocorrentes desde o epidídimo até o momento da ejaculação. As anomalias espermáticas secundárias compreendem as cabeças normais destacadas, espermatozoides com gotas citoplasmáticas persistentes, caudas dobradas e desprendimento da *Galea capitis*. Finalmente, no terceiro grupo, o autor reuniu a ocorrência de outras células primitivas comumente verificadas em touros com degeneração testicular, hemácias, piócitos, células epiteliais e medusas.

Posteriormente, com os progressos na microscopia, dos métodos de pesquisa e o interesse cada vez maior dos pesquisadores, novas formas patológicas do espermatozoide foram sendo descritas, bem como os seus significados. De grande importância foram as investigações de Rao (1971), o qual indicou que os desvios de forma da cabeça (estreita, pequena normal, gigante, curta e larga) não estão ligados a distúrbios do testículo, assim como o conhecimento do verdadeiro significado da gota proximal e do *Dag Defect*. Face a estes progressos, a antiga classificação das anomalias espermáticas primárias e secundárias tornou-se imprópria e, então, Blom (1972) criou nova classificação para as alterações anatômicas do espermatozoide, que passaram a ser considerados em duas classes: Defeitos maiores e Defeitos menores. Considerou como “Defeitos maiores” qualquer tipo de anormalidade correlacionada com prejuízos de fertilidade ou com uma condição patológica do testículo ou epidídimo, dentre elas: subdesenvolvimento, formas duplas, *Knobbed sperm*, decapitado, diadema, piriforme, estreito na base, contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça destacada anormal, peça intermediária em saca-rolhas, outros defeitos de peça intermediária, gota proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada. Analogamente, classificou como “Defeitos menores” outros desvios de forma, aparentemente de menor importância, como cabeça delgada, cabeça pequena normal, cabeça gigante, curta e achatada, cabeça normal destacada, acrossomo destacado, inserção abaxial, gota distal, cauda dobrada ou enrolada, e cauda enrolada na extremidade.

Mais recentemente, outra classificação morfológica dos espermatozoides foi sugerida. Nesta classificação, as alterações morfológicas foram divididas como compensáveis ou não compensáveis (Saacke et al., 2008). Do nosso ponto de vista, é uma classificação de cunho mais acadêmico e com utilidade restrita para a avaliação andrológica de rotina comercial. Contudo, importante de ser conhecido pelo médico veterinário andrologista.

Essa classificação considera que os espermatozoides anormais podem reduzir a fertilidade de um macho por dois motivos principais. O primeiro deles é pela sua eventual incapacidade em alcançar o local da fertilização, muitas vezes atribuída a defeitos que influenciam negativamente no transporte espermático. Esses defeitos causam redução da motilidade espermática e fazem com que os espermatozoides tenham menor probabilidade de transcender com sucesso o trato reprodutivo feminino. São anomalias morfológicas denominadas de “defeitos compensáveis”, dentre as quais poderiam ser citadas defeitos de cauda, gotas citoplasmáticas e defeitos sutis no formato da cabeça. Segundo este tipo de classificação, em tese, um aumento no número de espermatozoides funcionalmente competentes poderia resolver ou mitigar o problema de fertilidade de um ejaculado ou de uma partida de sêmen. Por outro lado, existem defeitos espermáticos que determinam ao espermatozoide, mesmo que este alcance normalmente o sítio de fertilização, uma incapacidade intrínseca para fertilizar o óvulo ou para sustentar o desenvolvimento embrionário inicial, com mais falhas acontecendo antes do reconhecimento materno da gestação. Essas anomalias espermáticas são denominadas de “defeitos não compensáveis” e, diferentemente do primeiro caso, não são passíveis de elevação da fertilidade, mesmo que haja um incremento no número de espermatozoides no ejaculado. Seriam considerados defeitos não compensáveis aqueles que alteram significativamente o formato da cabeça espermática, bem como defeitos na estrutura da cromatina (Saacke et al., 1994, 2000).

Morfologia espermática: origem, interpretação e impacto na fertilidade

Se tomarmos por base um grande número de publicações, pode-se observar que de uma forma geral a relação entre morfologia espermática e fertilidade varia de 0,06 a 0,86; ou seja, apresenta desde baixa até muito alta correlação com a fertilidade (Rodríguez-Martínez, 2005).

Para Casagrande et al. (1979), a relação entre a morfologia espermática e a fertilidade tem sido descrita desde há muito tempo por um grande número de autores e muitos deles sugerindo ou fixando os seus limites para sêmen de fertilidade normal. Lagerlöf (1934), por exemplo, estabeleceu que para touros de alta fertilidade as alterações de cabeça do espermatozoide estão entre 10 e 12%, com um limite máximo de 20%, e que a presença da gota proximal não pode ultrapassar 3% em touros normais. O mesmo Lagerlöf (1936) é de opinião de que 20% ou mais de espermatozoides “patológicos” e uma acentuada elevação na porcentagem de formas imaturas, seriam indicativos de distúrbios na espermatogênese. Como já citado, as alterações morfológicas dos espermatozoides podem ser classificadas com base na origem da alteração em defeitos primários, que ocorrem durante a espermatogênese, no testículo; defeitos secundários, causados durante a maturação espermática, no epidídimo, e defeitos terciários, que ocorrem após a liberação do espermatozoide (Blom, 1950b; Wenkoff, 1988; Severo, 2009).

Todavia, a classificação binária dos defeitos em maiores ou menores é a mais empregada, sendo os



defeitos maiores mais relacionados com infertilidade e doenças testiculares ou epididimárias, enquanto que os defeitos menores são referentes a anomalias de menor impacto na fertilidade. Para a interpretação do resultado do espermograma, devem ser considerados os percentuais de defeitos maiores, menores e defeitos totais (Blom, 1973; Silva et al., 1993). Ainda devem ser incluídas as presenças de medusas, células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, neutrófilos e bactérias (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 1998).

Defeitos maiores

Os defeitos maiores abrangem alterações de acrossomo, a presença de gota citoplasmática proximal, patologias de cabeça, alterações de peça intermediária, patologias de cauda e formas teratológicas (Blom, 1973).

Defeitos de acrossomo

Os defeitos de acrossomo incluem acrossomo rompido, enrugado ou dobrado, destacado e *knobbed acrosome* ou grânulo persistente do acrossomo (Barth e Oko, 1989; Amaral et al., 2009). O rompimento do acrossomo pode ocorrer por falhas na espermatogênese, durante a maturação e transporte espermático, tanto quanto após o processo de criopreservação do sêmen.

O *Knobbed Acrosome* é referente à presença de uma estrutura em forma de um grânulo refringente próximo da crista apical espermática, resultante de excesso de matriz acrossomal e dobra da crista acrossomal, podendo apresentar um achatamento ou um entalhamento no ápice do acrossomo, que ocorre por alteração da espermatogênese (Teunissen, 1946; Rollinson e Makinson, 1949; Blom e Birch-Andersen, 1962; Barth e Oko, 1989). A estrutura pode conter resquílios de membrana de células de Sertoli ou do aparelho de Golgi ou mesmo dobra da membrana acrossomal externa em si mesma (Bane e Nicander, 1966; Barth e Oko, 1989; Vale Filho, 2001). A origem desta alteração pode ser genética (Thundathil et al., 2000), causada por um gene recessivo autossômico de penetração incompleta ligado ao sexo ou ambiental (Garcia, 2004; Chenowet, 2005). Quando alta porcentagem da alteração está presente por um período longo é possível que seja de origem genética, quando ela está associada a outras alterações espermática suspeita-se de alteração ambiental. Não é raro encontrar uma baixa porcentagem de espermatozoides com *knobbed acrosomes* no sêmen de touros afetados por uma perturbação na espermatogênese. Nesses casos, os *knobbed acrosomes* são encontrados em associação a outros defeitos, seja dentro da mesma célula ou em espermatozoides distintos. Touros com distúrbios na espermatogênese, em que a incidência de *knobbed acrosomes* seja extremamente alta, raramente são encontrados (Barth e Oko, 1989).

Qualquer alteração que comprometa a integridade do acrossomo pode resultar em grande redução na fertilidade. Reprodutores que apresentam alta porcentagem dos espermatozoides ejaculados com alterações de acrossomo apresentam índices de fertilidade próximos da esterilidade, pois esta alteração impede a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida (Blom, 1948; Donald e Hancock, 1953; Barth e Oko, 1989).

O prognóstico da recuperação da taxa de fertilidade de animais com espermatozoides com alterações de acrossomo depende da origem da alteração. Se esta for de origem genética, o prognóstico é reservado a ruim; entretanto, se for de origem ambiental, seu prognóstico pode ser bom, desde que removida a causa em tempo hábil para a restauração da espermatogênese normal (Barth e Oko, 1989).

Gota citoplasmática proximal

A gota proximal origina-se nas fases finais da espermiogênese e refere-se à manutenção dos corpos residuais oriundos das organelas que compunham o citoplasma das espermátides (Herms et al., 1994). Assim, durante a espermiogênese, a maioria do citoplasma é eliminada, permanecendo apenas uma pequena quantidade, que fica aderida à porção proximal da peça intermediária, próxima à cabeça, proveniente da ponte intercelular, que liga as células germinativas durante a espermatogênese. Esse resquílio de citoplasma é denominado gota citoplasmática ou gota protoplasmática. Durante a maturação espermática no epidídimo, a gota citoplasmática se desloca da porção proximal para a distal da peça intermediária, sendo liberada da peça intermediária antes da ejaculação (Branton e Salisbury, 1947; Rao et al., 1980; Barth e Oko, 1989; Carreira, 2008).

O processo de desprendimento das gotas não é bem compreendido. Supõe-se que a membrana celular deve se romper na região anelar para permitir a liberação da gota. Presumivelmente, essa “quebra” na membrana celular é, então, reparada. A maior migração da gota ocorre quando os espermatozoides estão em trânsito pela região média da cabeça do epidídimo, mas existe uma quantidade substancial de migração das gotas que ocorre durante o trânsito pelo corpo do epidídimo. Dessa forma, as gotas citoplasmáticas proximais são mais prevalentes na cabeça do epidídimo, enquanto as gotas citoplasmáticas distais ocorrem com mais frequência no sêmen em trânsito pela cauda do epidídimo (Barth e Oko, 1989).

Por isso, a presença de gotas citoplasmáticas proximais em alta porcentagem no ejaculado está associada à anormalidade da espermatogênese e a distúrbios da função epididimária, com redução da fertilidade. Níveis entre 5 e 10% de gotas proximais, quando persistentes nos ejaculados, podem estar associados a sêmen



com baixa motilidade e fertilidade reduzida. Níveis acima de 15% no espermograma induzem à queda da taxa de fertilização e prejudicam o desenvolvimento embrionário (Blom, 1977b; Amann et al., 2000; Amaral et al., 2009).

Em touros adultos, a presença de gotas citoplasmáticas é indicativa de processo degenerativo testicular, muito embora seus percentuais sejam variáveis e inespecíficos, podendo ocorrer tanto no início quanto no final da degeneração. Já em animais jovens, a alta incidência de gota citoplasmática proximal se deve à imaturidade sexual, declinando para percentuais normais com a maturidade (Lagerlöf, 1934; Wenkoff, 1988; Barth e Oko, 1989). Ainda, trabalho realizado pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto com objetivo de avaliar a integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de (GCP) gota citoplasmática proximal, verificou-se que altos índices de GCP afetaram a integridade da membrana acrossomal e plasmática bem como a presença de potencial mitocondrial (Carreira, 2008). No entanto, a alta incidência de GCP não promoveu aumento na porcentagem de injúrias à cromatina após descongelamento, mas os resultados sugerem que podem ser mais sensíveis à desnaturação quando incubados por três horas. Os índices de produção de embriões *in vitro* podem ter sido afetados pela interação da alteração morfológica e o efeito individual do touro.

Patologias da cabeça espermática

Dentre as alterações da cabeça espermática consideradas como defeitos maiores, estão incluídas: estruturas subdesenvolvidas, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, cabeça estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal, contorno anormal da cabeça e presença de vacúolos na cabeça (*Pouch formation*; Blom, 1973; Amaral et al., 2009; Freneau, 2011).

As modificações na cabeça espermática estão associadas a alterações transitórias ou permanentes na espermiogênese, decorrentes de lesões traumáticas testiculares, estresse calórico, febre, excesso de proteína na ração (acima de 15% de proteína bruta), doenças sistêmicas, uso prolongado de corticoides, nas hipoplasias mais graves e, ainda, podem ser de origem genética (Chenoweth, 2005). Ressalta-se que defeitos de cabeça estão intimamente associados a anormalidades na condensação da cromatina espermática. Participam da redução da fertilidade (subfertilidade) temporária ou permanente, e estão associadas à baixa taxa de clivagem e ao menor desenvolvimento embrionário (Amaral et al., 2009).

As cabeças subdesenvolvidas apresentam características bem atípicas, são bem menores que o normal e podem ser indicativas de anormalidades no processo da espermatogênese, e, quando em grande número, podem afetar a fertilidade (Wenkoff, 1988).

A cauda enrolada na cabeça ocorre após a formação do espermatozoide, durante a maturação espermática, no epidídimo. Quando o ambiente epididimário apresenta condições osmóticas diferentes daquelas dos túbulos testiculares, ocorre o choque osmótico no espermatozoide, o qual responde enrolando a cauda sobre a cabeça. Esta célula não apresenta motilidade, por isso é incompatível com a fertilização. Assim, estudos sugerem que o enrolamento da cauda pode estar relacionado às alterações da osmolaridade normal do fluido epididimário (Cupps e Briggs, 1965; Joseph et al., 2010).

A hipótese que a deficiência de zinco atua como um fator direto na má formação das fibras densas é suportada pela descoberta de que, durante o seu desenvolvimento, as fibras densas são os principais componentes da cauda que se ligam ao zinco (Amir, 1975; Blom, 1977a). O excesso de zinco também foi relacionado como fator causal do defeito *Dag* em bovinos (Blom, 1950b citado por Barth e Oko, 1989) e no enrolamento da cauda de espermatozoides humanos em suspensão (Coulter e Kozub, 1984; Barth e Oko, 1989).

A ocorrência de cabeça isolada patológica é originária da fragilidade da ligação da peça intermediária, que desprende a cauda com o início da motilidade, juntamente com outra alteração, como contorno anormal ou defeitos de acrossomo, por alteração na espermatogênese (Wenkoff, 1988; Barth e Oko, 1989). A cabeça isolada patológica é classificada como um defeito primário ou maior. O desprendimento da cabeça é frequentemente uma consequência de anomalias na placa basal da fossa de implantação (que é de origem nuclear). Cabeças anormais soltas são frequentemente piriformes ou delgadas na base (Wenkoff, 1988).

Em espermatozoides anormais, a placa basal (ou lâmina basal) frequentemente não se forma completamente e não se conecta com a base da cabeça. Estas anormalidades resultam em instabilidade grave da região de implantação. A cabeça e cauda parecem estar ligadas apenas pela membrana celular. A linha de separação normalmente está distal à placa basal. A desintegração na cabeça do epidídimo coincide com o período em que as células ganham alguma motilidade, e com a migração da gota citoplasmática da região do colo à extremidade distal da peça intermediária. É provável que esta frágil ligação da cabeça com a cauda seja rompida devido à iniciação do movimento celular e migração da gota. Os segmentos proximais das caudas destacadas apresentam-se geralmente distendidas devido a uma acumulação irregular de mitocôndrias de vários tamanhos. Frequentemente, a peça intermediária se curva ao redor da gota citoplasmática (Blom e Birch-Andersen, 1965; Barth e Oko, 1989).

Cabeça estreita na base apresenta formato normal, com afilamento na porção inferior, pode algumas vezes ser característica do animal. Cabeça piriforme é o afilamento mais severo da base da cabeça. Estas



alterações da cabeça são decorrentes de alterações no formato do núcleo da espermátide. Por estas células apresentarem motilidade e acrossomo normal, podem fertilizar o oócito, numa taxa mais baixa, mas o desenvolvimento embrionário não ocorre por anomalias na cromatina (Wenkoff, 1988; Barth e Oko, 1989).

Cabeças piriformes e estreitas na base

Estes defeitos primários ou maiores, frequentemente encontrados, são importantes e comuns a todas as raças. As cabeças dos espermatozoides afetados apresentam material nuclear mal distribuído, resultando em variações no tamanho nuclear em vários tipos e graus, que podem variar de estreitamento pós acrossomal leve à grave (cabeças piriforme), e às vezes assimetria de todo o núcleo. Pode ser difícil diferenciar cabeças ligeiramente estreitas na base de cabeças normais que são mais longas e/ou mais estreitas do que o habitual. Embora a diferenciação entre piriforme e estreita na base pode não ser importante, um erro comum e grave é negligenciar as formas sutis de "base-estreita" do defeito de estreita na base. Os defeitos piriforme e estreita na base podem ser de causa hereditária, mas também podem ser encontrados em casos de hipoplasia ou degeneração testicular leve. O prognóstico para a recuperação é favorável apenas em casos de degeneração testicular reversível (Wenkoff, 1988).

Espermatozoides com anormalidades de forma e tamanho da cabeça geralmente tem boa mobilidade e possuem acrossomos normais. Assim, parece razoável supor que essas células poderiam facilmente fazer contato com o oócito e seriam capazes de penetrar a zona pelúcida e iniciar uma reação cortical. No entanto, uma vez que o sêmen com uma grande proporção de cabeças piriformes ou estreitas na base é de baixa fertilidade, estes espermatozoides podem ou não iniciar a fertilização, mas o desenvolvimento embrionário não progride muito longe se a fertilização ocorrer. Poucos estudos foram feitos para determinar em que ponto ocorre a falha da fertilidade. Em um estudo, utilizando novilhas superovuladas para determinar as taxas de fertilização de uma amostra sêmen com elevados níveis de defeitos espermáticos, foi demonstrado que a cabeça piriforme resultou na redução do número de oócitos fertilizados comparado ao sêmen controle (Barth et al., 1992). Estes resultados indicam que os núcleos de formato anormal não são capazes de iniciar nem mesmo a primeira clivagem embrionária. Mais pesquisas nesta área são necessárias (Barth e Oko, 1989). Vale resaltar que, para alguns animais, principalmente os zebuínos, a cabeça estreita na base apresenta-se em proporção elevada, acima de 90% e, tudo indica que seu DNA esta normal devido ao relato, nestes animais, de fertilidade normal.

O contorno anormal é designado por alterações na cabeça espermática originária de falhas na espermatogênese. Podem ocorrer em níveis variados, mas são encontrados em animais em processo de degeneração testicular, geralmente associados a outros defeitos maiores (Garcia, 2004).

Pouch formation (crateras e vacúolos)

Pouch formation (crateras) são defeitos que ocorrem durante a espermatogênese. São caracterizados como invaginações da membrana para dentro do núcleo que se assemelham a crateras na microscopia de contraste de interferência. Podem ocorrer em qualquer parte da cabeça espermática, no entanto, a localização mais comum, em bovinos, é na região equatorial. Os vacúolos estão presentes no interior da cabeça espermática, de forma mais ou menos esféricas ou ovais (Bane e Nicander, 1965; Wenkoff, 1988).

Pouch formations grandes ou múltiplos que distorcem a forma da cabeça dos espermatozoides raramente são encontrados. Entretanto, a forma mais comum de ocorrência é de crateras pequenas, podendo se apresentar distribuídas na forma de "diadema" (*Diadem defect*) na região pós-acrossomal (Wenkoff, 1988).

Embora estes tipos de defeitos da membrana nuclear sejam defeitos espermáticos que apresentam certa ocorrência, frequentemente são negligenciados pelos avaliadores, principalmente quando as avaliações são realizadas em esfregaços corados (adaptado de Barth e Oko, 1989). Para a visualização do *pouch formation*, é necessária uma ampliação da imagem celular em no mínimo 1000X, com boa resolução, sob microscopia de contraste de fase ou de contraste de interferência diferencial (DIC; Wenkoff, 1988; Barth e Oko, 1989).

Os espermatozoides com *pouch formation* ou vacúolos nucleares apresentam algum tipo de alteração no seu DNA (defeitos de cromatina). Estes defeitos parecem estar associado com degeneração testicular leve relacionada ao estresse, uma vez que outros defeitos e achados consistentes com degeneração leve com frequência estão presentes. Um aumento da incidência desses defeitos (em touros já afetados) pode ser induzido pela administração de glicocorticoides (Wenkoff, 1988).

A presença do defeito "diadema" é inconsistente; pode estar presente em grande número em um ejaculado e desaparecer em ejaculados subsequentes. O efeito de um vacúolo pequeno simples sobre a fertilidade não é bem compreendido e provavelmente de pequena importância (Wenkoff, 1988).

Alterações de peça intermediária

Várias são as alterações observadas na peça intermediária, como fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogotas e outras, sendo todas consideradas como defeitos maiores. A fibrilação é observada como se



a peça intermediária fosse formada por vários filamentos. As fraturas total ou parcial também podem ser observadas. O edema da peça intermediária ocorre geralmente por um desarranjo na disposição das mitocôndrias. A presença de pseudogotas pode ser de origem hereditária, é uma protuberância que contém grânulos densos envolvidos por uma ou mais camadas mitocondriais aparentemente normais, dando o aspecto da presença de uma gota, por isso, o nome pseudogota; todavia, aparecem como uma proeminência unilateral (Blom, 1973; Vale Filho et al., 1977; Wenkoff, 1988; Rocha et al., 2006).

Ainda, as alterações da peça intermediária ocorrem durante a espermiogênese, especialmente entre as fases cinco e 11 (Barth e Oko, 1989). Compõem defeitos do tipo peça intermediária fraturada, desnuda, enrolada (*dag defect*) e hipoplásica (*tail stump*). Touros com esses defeitos apresentam baixa motilidade e vigor sem que haja melhora nas colheitas subsequentes, indicando que esses defeitos são originários dos túbulos seminíferos e não do processo de maturação espermático após a espermiogênese. Esses defeitos ocorrem por causa da perda e/ou desorganização dos feixes de fibras internas e mitocôndrias localizadas na região do espermatozoide (Amaral et al., 2009).

Todas as alterações da peça intermediária interferem na produção de energia, ou seja, na produção de ATP, necessário para que ocorra o batimento flagelar. Portanto, esta alteração está diretamente relacionada com a motilidade espermática (Celeghini et al., 2007).

Patologias da cauda

As alterações da cauda dentro dos defeitos maiores incluem cauda fortemente dobrada e enrolada ou dobrada com gota citoplasmática distal (Blom, 1973). Estas alterações ocorrem durante a maturação espermática, no trânsito pelo epidídimo, onde as caudas se dobram depois de formadas, por alguma alteração, que pode ser por choque osmótico. Como neste estágio a gota citoplasmática está sendo eliminada, com a dobra da cauda ela fica retida. Esta alteração está presente em processos degenerativos dos testículos ou na imaturidade sexual, sendo alterado o ambiente epididimário (Koefoed-Johnsen et al., 1980; Arriola et al., 1985).

Formas teratológicas

As formas teratológicas referem-se aos espermatozoides aberrantes, contendo cabeça, cauda e/ou peça intermediária supranumerária. São alterações que ocorrem durante a espermatogênese e, quando em grande número pode afetar a fertilidade severamente (Wenkoff, 1988; Kopp et al., 2007).

Defeitos menores

Os defeitos menores abrangem patologias da cabeça, alterações de inserção entre peça intermediária e cabeça, cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal (Blom, 1973).

Patologias da cabeça

Dentre os defeitos menores, as patologias de cabeça são: cabeça delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal.

A presença de cabeças com o formato alterado, como delgada, gigante, curta, larga, pequena normal pode ser consequência de transtornos durante a meiose do espermatócito, decorridos da distribuição anormal do número de cromossomos, originando volume maior ou menor do núcleo (Wenkoff, 1988).

A cabeça isolada normal pode ocorrer por ligações mais frágeis entre a inserção da peça intermediária e o colo, a qual no início da motilidade se desprende, resultando na presença de cabeças e caudas soltas no ejaculado (Blom e Birch-Andersen, 1965; Barth e Oko, 1989).

Um aumento da proporção de cabeças isoladas é frequentemente visto como um fenômeno transitório associado com a degeneração testicular ou uma condição inflamatória das glândulas vesiculares, ampolas e epidídimos (Blom, 1950b; Wright, 1974). Outras condições que causam aumento da temperatura dos testículos, seja por insulação experimental, doença ou dor que faz com que o touro se deite por muito tempo irá aumentar a proporção de cabeças isoladas no sêmen (Cooper e Peet, 1984; Barth e Oko, 1989).

Inserções abaxial, retroaxial e oblíqua

As alterações na inserção entre a cabeça e a peça intermediária, no colo, podem ser abaxial, quando a inserção não ocorre no centro, mas numa região marginal; retroaxial, quando a inserção se dá de forma que a cauda encontra-se refletida sobre a cabeça, e a inserção oblíqua, quando a inserção forma um ângulo agudo com a cabeça. Estes defeitos podem promover uma alteração no padrão de batimento (Barth, 1989; Plessis e Soley, 2012).

Em equinos, a inserção abaxial é considerada como normal, não sendo contada como defeito durante a



contagem das alterações morfológicas.

Cauda dobrada ou enrolada

Classifica-se um espermatozoide como portador de cauda dobrada ou enrolada quando há uma dobra simples ou enrolamento na porção final da cauda. Esta alteração pode ocorrer por choque térmico, devendo-se tomar cuidado na leitura, pois pode ser ocasionada se o sêmen for fixado em formol frio ou quando o esfregaço é preparado com lâmina fria. Contudo, quando a técnica do esfregaço corado é utilizada, esta alteração não pode ser considerada, por esta técnica ser passível de artefato durante o preparo do esfregaço (Mies Filho, 1978; Vale Filho et al., 2010).

Gota citoplasmática distal

A gota citoplasmática distal é eliminada durante a maturação espermática ou mesmo durante seu transporte. Sua permanência após a ejaculação é considerada como um defeito de menor importância do que a gota proximal, pois há uma chance desta gota ser eliminada durante o trajeto do espermatozoide no trato reprodutivo feminino (Mies Filho, 1978; Vale Filho et al., 2010).

Disfunção epididimária associada a problemas bioquímicos, infecciosos ou genéticos

Na disfunção do epidídimo descrita nos bovinos por Gustafsson (1966) e Vale Filho (1975), o animal geralmente apresenta um quadro caracterizado por alteração na morfologia dos espermatozoides ligada à cauda anormal, com um quadro permanente de alta incidência de caudas dobradas e gota citoplasmática proximal ou distal. Essa anormalidade é consequência de alterações bioquímicas no líquido epididimário, com altas concentrações de glicerosforilcolina, nível anormal de Na^+/K^+ na composição do plasma seminal ou devido a altos níveis de estrógenos ligados a desequilíbrios endócrinos (Crabo, 1965; Gustafsson, 1966; Einarsson e Gustafsson, 1973). A disfunção epididimária também pode ter origem infecciosa (Vale Filho, 1975; Vale Filho et al., 1978), nestes casos, pode-se encontrar secreção purulenta no ejaculado e, ao esfregaço corado nota-se presença de neutrófilos e/ou linfócitos. A disfunção epididimária tem sido encontrada em reprodutores zebuínos, especialmente nos da raça Gir, estando muitas vezes ligada a fatores hereditários (Vale et al., 2008), neste caso, o diagnóstico é estabelecido pelo histórico clínico da baixa fertilidade do reprodutor. Entretanto, existe a necessidade de se realizar prova de exaustão no animal, com a colheita de no mínimo seis ejaculados com intervalo de uma hora, para se confirmar essa enfermidade.

Segundo Vale Filho et al. (2010), na disfunção do epidídimo observa-se o seguinte padrão de defeitos espermáticos: 1) na disfunção da cabeça do epidídimo observa-se no ejaculado alta prevalência de gotas citoplasmáticas proximais, e/ou com fratura da peça intermediária dos gametas; 2) na disfunção da cauda do epidídimo, ocorre alta prevalência de espermatozoides com caudas dobradas, sendo quadro constante, com gotas citoplasmáticas distais.

Embora com alguma controvérsia, o epidídimo pode desempenhar a função de selecionador de espermatozoides anormais. Sutovsky et al. (2001) identificaram evidências morfológicas e bioquímicas de que a ubiquitina, um marcador proteolítico universal, que também está envolvido no mecanismo de endocitose, é encontrada predominantemente na superfície de espermatozoides defeituosos; dessa forma, atuaria no “controle de qualidade dos espermatozoides” durante a passagem pelo epidídimo.

Outros elementos encontrados no sêmen

Os outros elementos deverão ser citados no laudo andrológico, quando presentes. A ocorrência deverá ser expressa como: rara, frequente e muito frequente, ou ainda, baixa ocorrência (+), média ocorrência (++) e alta ocorrência (+++).

- Medusas: originam-se de degenerações ou hipoplasias testiculares graves, em que células epiteliais ciliadas se desprenderam de ductos do trânsito espermático posterior aos túbulos seminíferos. Podem ser perfeitamente vistas tanto na lâmina corada quanto nas preparações úmidas.
- Células primordiais (Células da linhagem espermatogênica): são células que se desprenderam do epitélio germinativo. Geralmente aparecem durante as degenerações testiculares graves. Podem ser facilmente visualizadas em preparação úmida.
- Células gigantes: nos quadros de degeneração grave ou hipoplasia, células do epitélio germinativo sofrem distúrbios do processo de divisão, que levam a condensação do material genético e à formação de núcleos picnóticos que evoluem para a formação de sincícios denominados células gigantes. Ou ainda, seriam também, a união de várias células do epitélio germinativo (células primordiais) e restos e citoplasmas que vão se organizando dentro dos ductos do aparelho reprodutor e a união de várias destas células dão origem a uma estrutura esférica com tamanho superior.



- Leucócitos: são observados nos processos inflamatórios do aparelho genito-urinário (piospermia).
- Hemácias: revelam lesão em alguma parte do aparelho genital (hemospermia).
- Células epiteliais: representam processo de descamação dos ductos do aparelho genital, principalmente em animais com longo tempo de repouso sexual. Aparentemente sua presença não tem significado patológico.

Instruções para avaliação da morfologia espermática

A contagem de alterações morfológicas deve ser realizada em lâmina preparada exclusivamente para tal fim. Deverão ser avaliadas no mínimo 200 células, contando-se células normais e apenas um defeito por célula anormal é computado. Caso sejam observados dois ou mais defeitos na mesma célula, deve ser registrado em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, se observados dois defeitos de mesma classificação, registra-se apenas o de maior frequência.

Deverá ser discriminada, individualmente, a incidência de anormalidades encontradas. Em casos particulares, poderão estar presentes anormalidades não citadas, que deverão ser incluídas. Quanto às citadas, poderão ser suprimidas do laudo as não identificadas. Deverá aparecer destacado no laudo a proporção exata de espermatozoides normais e anormais na amostra.

A ordenação das anormalidades baseando-se em outro tipo de classificação poderá ser apresentada no laudo, a critério do médico veterinário responsável. A discriminação das anormalidades encontradas com sua respectiva frequência de ocorrência permitirá, a qualquer médico veterinário, usar este ou aquele método de classificação das mesmas para fazer sua própria interpretação de um laudo.

Padrões utilizados para a avaliação do potencial de fertilidade do sêmen bovino

Não se pode esquecer que, no momento, a Instrução Normativa nº 53, de 27 de setembro de 2006 (Brasil, 2006), que trata do regulamento para registro e fiscalização dos Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) bovino, cita em informações que o CCPS deve disponibilizar aos compradores do sêmen. São elas: volume da dose em mL; motilidade progressiva em percentagem; vigor em escala de 0-5; defeitos totais e maiores em percentagem e número de espermatozoides por dose.

Segundo o Grupo de Trabalho de Andrologia Bovina, instituído pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento-MAPA (Brasil, 2009) para proceder à revisão do “Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal”, houve consenso em recomendar para ejaculados de touros os seguintes padrões: Espermatozoides normais - valor mínimo de 70% de células normais. Esta é a característica isolada que tem maior importância para a fertilidade do touro no rebanho; Defeitos maiores - o valor máximo de tolerância de até 20%. O rigor ou tolerância na interpretação dessa característica deve levar em consideração o quadro clínico e espermático do animal e inclusive a distribuição dos defeitos individuais; Defeitos menores - o valor máximo de tolerância de até 30%, respeitado o limite de 70% de normais e, inclusive, a distribuição dos defeitos individuais; Defeitos individuais - sugere-se que os limites individuais de anormalidades sejam de até 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores.

O Grupo de Trabalho “Técnicas de Avaliação Espermática”, instituído pela mesma Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), como citado acima, reunido em 2011, recomendou os seguintes padrões para utilização do Sêmen Bovino Congelado (Convencional): a) volume da dose 0,25 ou 0,5 ml; b) Motilidade progressiva $\geq 30\%$; c) Vigor ≥ 3 ; (descongelamento a 35-37°C, por um tempo mínimo de 30 s ou conforme recomendações do estabelecimento produtor); d) para doses com $= 10 \times 10^6$ de espermatozoides com motilidade progressiva: defeitos totais $\leq 30\%$ e defeitos maiores $\leq 20\%$; e) para doses com 6×10^6 a $< 10 \times 10^6$ de espermatozoides com motilidade progressiva: defeitos totais $\leq 20\%$ e defeitos maiores $\leq 10\%$.

Já para Sêmen Bovino Congelado Sexado (descongelamento 35-37°C, por um tempo mínimo de 30 s ou conforme recomendações do estabelecimento produtor), as recomendações são: a) volume da dose 0,25 ml; b) motilidade progressiva $\geq 35\%$; c) Vigor ≥ 2 ; d) alterações morfológicas: defeitos totais $\leq 20\%$ e defeitos maiores $\leq 10\%$.

No entanto, levando-se em consideração comunicação pessoal, para a comercialização do sêmen sexado “industrializado” pela Sexing Technologies (Brasil), toda partida de sêmen deve apresentar as seguintes características: $2,1 \times 10^6$ de espermatozoides totais na dose de 0,25 ml, 45% de motilidade pós-descongelamento, 30% de motilidade após 30 min a 37°C; ainda, até 15% de defeitos espermáticos primários, até 15% de defeitos espermáticos secundários e o total de anormalidades de no máximo 25%.

Em todos os casos, em relação aos defeitos individuais, sugere-se que os limites individuais de anormalidades estejam em torno de 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores. Entretanto, a interpretação desses valores não é matemática, e sim biológica. Ou seja, a conclusão da avaliação deve ser em função de todos os achados biológicos encontrados, bem como a(s) técnica(s) utilizada(s).



Considerações finais

Desde o início do século passado, vários pesquisadores tentam sugerir padrões mínimos para que se obtenha alta fertilidade, seja para touros em regime de monta natural a campo, seja para partidas de sêmen após a descongelamento. No entanto, até o momento, morfologia espermática tem sido tema de muitos debates e controvérsias. Apesar de bastante estudado e, em função da importância, devemos considerar que este assunto deva estar sempre em discussão.

Referências

- Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB.** Apoptosis in the germ line. *Reproduction*, v.141, p.139-150, 2011.
- Amann RP, Schanbacher BD.** Physiology of male reproduction. *J Anim Sci*, v.57, supl. 2, p.380-403, 1983.
- Amann RP, Seidel GE, Mortimer RG.** Fertilizing potential in vitro of sêmen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, v.54, p.1499-1515, 2000.
- Amaral TB, Sereno JRB, Pellegrin AO (Ed).** Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos: dados eletrônicos. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 216p. Disponível em: <<http://www.epac.embrapa.br/download/1541/t>>. Acesso em: 17 mar. 2015.
- Amir D.** Individual and age differences in the spermicidal effect of ethylene dibromide in bulls. *J Reprod Fertil*, v.44, p.561-565, 1975.
- Arriola J, Johnson LA, Kaproth M, Footel RH.** A specific oligoteratozoospermia in a bull: the sperm tail stump defect. *Theriogenology*, v.23, p.899-913, 1985.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-151, 2011.
- Bane A, Nicander L.** Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J Reprod Fertil*, v.11, p.133-138, 1966.
- Bane A, Nicander L.** Pouch formations by invaginations of the nuclear envelope of bovine and porcine sperm as a sign of disturbed spermiogenesis. *Nord Vet Med*, v.17, p.628-632, 1965.
- Barth AD.** Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. *Can Vet J*, v.30, p.656-662, 1989.
- Barth AD, Bowman PA, Bo GA, Mapletoft RJ.** Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. *Can Vet J*, v.33, p.31-39, 1992.
- Barth AD, Oko RJ.** Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- Bialy J, Smith VR.** Influence of seminal vesicular fluid on morphology of bull spermatozoa. *J Dairy Sci*, v.41, p.422-428, 1958.
- Blom E.** A decapitated sperm defect in two sterile hereford bulls. *Nord Vet Med*, v.29, p.119-123, 1977a.
- Blom E.** Interpretation of spermatic citology in bulls. *Fertil Steril*, v.1, p.223-238, 1950a.
- Blom E.** Om spermaundersogelsemetoder hos Tyren. *Medlemsbl Danske Dyrlaegeforen*, v.31, p.446, 1948.
- Blom E.** Sperm morphology with reference to bull infertility. In: *First All-India Symposium on Animal Reproduction, 1977, Ludhiana, India. Proceedings...* Ludhiana: The Symposium, 1977b. p.61-81.
- Blom E.** The evaluation of bull semen with special reference to its use in artificial insemination (trans.). Thesis. Copenhagen: Mortensen, 1950b. 89p.
- Blom E.** The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: *Symposium Internationale de Zootechnie, 7, 1972, Milano, Italy. Proceedings...* Milano: SIZ, 1972.
- Blom E.** The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-339, 1973.
- Blom E, Birch-Andersen A.** The ultrastructure of the bull sperm. II. The sperm head. *Nord Vet Med*, v.17, p.193-212, 1965.
- Blom E, Birch-Andersen A.** Ultrastructure of the decapitated sperm defect in Guernsey bulls. *J Reprod Fertil*, v.23, p.67-72, 1970.
- Blom E, Birch-Andersen A.** Ultrastructure of the sterilizing knobbed sperm defect in the bull. *Nature*, v.194, p.989-990, 1962.
- Branton C, Salisbury GW.** Morphology of spermatozoa from different levels of the reproductive tract of the bull. *J Anim Sci*, v.6, p.154-160, 1947.
- Brasil.** Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 53, 27 de setembro de 2006. Regulamento para Registro e Fiscalização de Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) Bovino, Bubalino, Caprino e Ovino. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de out. 2006. Sec. 1.
- Brasil.** Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Portaria nº 109, de 25 de maio de 2009. Institui



- Grupo de Trabalho no âmbito do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários - DFIP/SDA, com a finalidade de atualizar o Manual de Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 maio 2009. Sec. 1, p.5.
- Carreira JT.** Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões in vitro de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008.
- Casagrande JF, Pinheiro LEL, Almeida CA, Ferraz JBS.** Patologia espermática agrupada Segundo Blom (1972) na avaliação de sêmen para congelamento. Rev Bras Reprod Anim, v.3, p.19-23, 1979.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. Reprod Domest Anim, v.42, p.479-488, 2007.
- Chenoweth PJ.** Genetic sperm defects. Theriogenology, v.64, p.457-468, 2005.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CRA).** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- Cooper AM, Peet RL.** Infertility in a Hereford bull associated with increased numbers of detached sperm heads in his ejaculate. Aust Vet J, v.60, p.225-226, 1984.
- Coulter GH, Kozub GC.** Testicular development, epididymal sperm reserves and seminal quality in two-year-old Hereford and Angus bulls: Effects of 2 levels of dietary energy. J Anim Sci, v.59, p.432-440, 1984.
- Crabo B.** Studies on composition of epididymal content in bulls and boars. Acta Vet Scand, v.22, suppl. 5, p.1-94, 1965.
- Cupps PT, Briggs JR.** Changes in the epididymis associated with morphological changes in the spermatozoa. J Dairy Sci, v.48, p.1241-1244, 1965.
- Dogan S, Mason MC, Govindaraju A, Belser L, Kaya A, Stokes J, Rowe D, Memili E.** Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm. J Reprod Dev, v.59, p.18-26, 2013.
- Donald HP, Hancock JL.** Evidence of a gene-controlled sterility in bulls. J Agric Sci, v.43, p.178-181, 1953.
- Einarsson S, Gustafsson B.** Some morphological characteristics of the bull spermatozoa at different levels of the epididymis. Nord Vet Med, v.23, p.14-20, 1973.
- Freneau GE.** Aspectos da morfologia espermática em touros. Rev Bras Reprod Anim, v.35, p.160-170, 2011.
- Freneau GE, Chenoweth PJ, Ellis R, Rupp G.** Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. Anim Reprod Sci, v.118, p.176-181, 2010.
- Garcia AR.** Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*). 2004. 258f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2004.
- Garner DL, Hafez ESE.** Espermatozoides e plasma seminal. In: Hafez ESE, Hafez B. (Ed.) Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p.97-110.
- Greep PO.** The male reproductive system. In: Greep RO, Koblinsky MA, Jaffe FS (Ed.). Reproduction and human welfare. Cambridge: MIT Press, 1976. p.165-277.
- Gustafsson E.** Luminal contents of the bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. Acta Vet Scand Suppl, n.17, p.1-80, 1966.
- Hermo L, Oko R, Morales CR.** Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. Int Rev Cytol, v.154, p.105-189, 1994.
- Holt WV.** Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg? Reprod Domest Anim, v.44, suppl. 3, p.31-38, 2009.
- Johanisson E, Campana A, Luthi R, Agostini A.** Evaluation of "round cells" in semen analysis: A comparative study. Hum Reprod Update, v.6, p.404-412, 2000.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL.** Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. Anim Reprod Sci, v.60/61, p.471-480, 2000.
- Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS.** Canine and feline theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 2001. 592p.
- Joseph A, Shur BD, Ko CM, Chambon P, Hess RA.** Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. Biol Reprod, v.82, p.958-967, 2010.
- Koefoed-Johnsen HH, Anderset JB, Andresen E, Blomce E, Philipsen H.** The dag defect of the tail of the bull sperm. Studies on the inheritance and pathogenesis. Theriogenology, v.14, p.471-475, 1980.
- Kopp C, Sukura A, Tuunainen E, Gustavsson I, Parvinen M, Andersson M.** Multinuclear-multiflagellar sperm defect in a bull - A new sterilizing sperm defect. Reprod Domest Anim, v.42, p.208-213, 2007.
- Kudryavtsev IV, Safronova LD, Kudryavtsev PI.** Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. Russ J Dev Biol, v.34, p.337-346, 2003.
- Lagerlöf N.** Morphologische untersuchungen ueber veränderungen im spermabilt und in den hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilitat. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl, n.19, p.1-254, 1934.



- Lagerlöf N.** Sterility in bulls. *Vet Rec*, v.41, p.1159-1173, 1936.
- Leite TG.** Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.
- Mies Filho A.** Tecnologia do sêmen. In: Mies Filho A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 4.ed. Porto Alegre, RS: Sulina, 1978. p.461-513.
- Mruk DD, Cheng CY.** Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*, v.25, p.747-806, 2004.
- Nöthling JO, Irons PC.** A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. *Theriogenology*, v.69, p. 603-611, 2008.
- Nöthling JO, Volkmann DH.** Dilatation of the ampullae and an increased incidence of loose sperm heads after bilateral vesiculectomy in a bull. *Reprod Domest Anim*, v.32, p.321-324, 1997.
- Plessis L, Soley JT.** Abaxial tail implantation in the emu, *Dromaius novaehollandiae*: morphological characteristics and origin of a rare avian sperm defect. *Theriogenology*, v.77, p.1137-1143, 2012.
- Rao AR, Bane A, Gustafsson BK.** Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, v.14, p.1-12, 1980.
- Rao AR.** Changes in the morphology of sperm during their passage thorough the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. 1971. 86f. Thesis - Royal Veterinary College, Stockolm, Sweden, 1971.
- Rocha A, Oliveira E, Vilhena MJ, Diaz J, Sousa M.** A novel apical midpiece defect in the spermatozoa of a bull without an apparent decrease in motility and fertility. A case study. *Theriogenology*, v.66, p.913-922, 2006.
- Rodriguez-Martinez H.** Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais... Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8p.CD-ROM. 2005.
- Rollinson DHL, Makinson JB.** Evidence of an inherited seminal character associated with infertility of Friesian bulls. *Vet Res*, v.61, p.373, 1949.
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim, APS, Clegg ED.** Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, 1990. 284p.
- Saacke RG.** Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, v.70, p.473-478, 2008.
- Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH.** Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.663-677, 2000.
- Saacke RG, Nadir S, Dalton JC, Bame JH, DeJarnette JM, Degelos S, Nebel RL.** Accessory sperm evaluation and bull fertility: an update. In: Technique Conference on Artificial Insemination and Reproduction. National Association of Animal Breeders, 15, 1994, Columbia, MO, USA. Proceedings... Columbia, MO: NAAB, 1994. p.57-67.
- Severo NC.** Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *Hora Vet*, v.28, n.167, p.36-39, 2009.
- Silva AEDF, Dode MAN, Unanian MM.** Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e outros fatores que a influenciam. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1993. 51p. (Documentos).
- Sutovsky P, Terada Y, Schatten G.** Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod*, v.16, p.250-258, 2001.
- Swanson EW, Boyd LJ.** Factors affecting coiled-tail spermatozoa in the bull. *Am J Vet Res*, v.23, p.300-309, 1962.
- Teunissen GHP.** Een afwijking van het acrosom (kopkap) bij de spermatowiden van een stier. *Tijdschr Diergeneeskd*, v.71, p.292, 1946.
- Thundathil J, Meyer R, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ.** Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, v.54, p.921-934, 2000.
- Vale WG, Ribeiro HFL, Sousa JS, Silva AOA, Barbosa EM, Rolim Filho ST.** Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.141-155, 2008.
- Vale Filho VR.** Disfunção do epidídimo em touros *Bos taurus* e *Bos indicus* criados no Brasil. 1975. 82f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, 1975.
- Vale Filho VR.** Subfertilidade em touros: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Cad Téc Vet Zootec*, n.35, p.81-87, 2001.
- Vale Filho VR, Andrade VJ, Azevedo NA.** Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. In: Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte, 3, 2010, Viçosa, MG. Anais... vol 1, Viçosa, MG: UFV, 2010. p.363-412.
- Vale Filho VR, Megale F, Garcia OS.** Incidência elevada de defeitos na bainha mitocondrial do espermatozoide e baixa eficiência reprodutiva em touros da raça Gir. *Rev Bras Reprod Anim*, v.1, p.31-39, 1977.
- Vale Filho VR, Pinto PA, Fonseca J, Soares LCS.** Patologia do sêmen: diagnóstico andrológico e classificação do *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil: de um estudo em 1088 touros. São Paulo, SP: Dow de Veterinária, 1978. 54p.



- Van Rensburg SWJ, Van Rensburg SJ, de Vos WH.** The significance of the cytoplasmic droplet in the disintegration of semen in Guernsey bulls. *Onderstepoort J Vet Res*, v.33, p.169-184, 1966.
- Wang C, Cui YG, Wang XH, Jia Y, Sinha Hikim A, Lue YH, Tong JS, Qian LX, Sha JH, Zhou ZM, Hull L, Leung A, Swerdloff RS.** Transient scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab*, v.92, p.3292-3304, 2007.
- Wenkoff MS.** The evaluation of bulls for breeding soundness. Manual. 2 ed. Ottawa: Canadian Veterinary Medical Association, 1988. 48p.
- Williams WW.** Technique of collecting semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. *Cornell Vet*, v.10, p.87-94, 1920.
- Williams WW, Savage A.** Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls: a review with additional notes. *Cornell Vet*, v.17, p.374-378, 1927.
- Williams WW, Savage A.** Observations on the seminal micropathology of bulls. *Cornell Vet*, v.15, p.353-375, 1925.
- Wright PJ.** Detached heads in the ejaculate of a Hereford bull. *Aust Vet J*, v.50, p.39-40, 1974.
- Zerobin VK, Bertschinger HJ.** Diploid DNA-content in sperms of brown swiss bulls. *Zuchthygiene*, v.13, p.113-120, 1978.
-