

# MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE TOUROS NELORE, PANTANEIRO E CURRALEIRO AVALIADA DE AMOSTRAS COLETADAS DIRETAMENTE DOS TESTÍCULOS E DOS EPIDÍDIMOS

Julio Ramos Reis<sup>1</sup>; Thaís Mendes Sanches Cavaleiro<sup>1</sup>; José Octavio Jacomini<sup>2</sup>

## RESUMO

Um dos fatores mais importantes a ser avaliado nos touros é a qualidade do sêmen desses animais, porque um bom reprodutor deve ter espermatozóides capazes de fecundarem e darem continuidade a um embrião normal. Objetivou-se com esse trabalho analisar a morfologia espermática de touros das raças Nelore, Pantaneiro e Curraleiro, em amostras que foram coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos. Foram observados os principais defeitos quanto à morfologia que acomete os espermatozóides, e foi verificada qual a porcentagem de células defeituosas morfológicamente e de células consideradas normais. Tal análise foi feita com ajuda de microscopia de contraste de fase. A média de porcentagem de defeitos maiores para as três raças foi de  $63,8 \pm 6,57$  no testículo,  $58,87 \pm 11,77$  na cabeça,  $12,07 \pm 7,95$  no corpo e  $14,2 \pm 10,4$  na cauda do epidídimo, e a porcentagem de defeitos menores foi de  $1,6 \pm 1,21$  no testículo,  $20,4 \pm 11,64$  na cabeça,  $33,93 \pm 12,54$  no corpo e  $52,4 \pm 22,84$  na cauda do epidídimo. O aumento dos defeitos na cauda do epidídimo está relacionado aos defeitos da cauda do espermatozóide mostrando que o ambiente neste local pode comprometer a morfologia dos mesmos. À medida que os espermatozóides percorrem o epidídimo os defeitos maiores vão diminuindo, enquanto que os menores vão aumentando.

Palavras chave: Espermatozóides, Reprodutores, Trato reprodutivo

<sup>1</sup> Graduando em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Bolsista Iniciação Científica, Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV. Campus Umuarama - Bloco 2T. Av. Pará, 1720 - Bairro Umuarama. Uberlândia - MG - CEP 38400-902. Email: julioramosreis@gmail.com

<sup>2</sup> Prof. Dr. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG. E-mail adress: jojacomini@ufu.br

## ABSTRACT

One of the most important factors to be evaluated in the bulls are semen quality, because a good breeder should have sperm capable of fertilize and give continuity to a normal embryo. The objective of this work is analyze the morphology of Nelore, Pantaneiro and Curraleiro bulls in samples that were collected directly from the testis and the epididymis. Were observed the main defects affecting the morphology sperm, and will be checked the percentage of morphologically abnormal cells and cells considered normal. This analysis was done with the aid of phase contrast microscopy. The average percentage of major defects for the three races was  $63.8 \pm 6.57$  in the testis,  $58.87 \pm 11.77$  in the head,  $12.07 \pm 7.95$  in the body and  $14.2 \pm 10.4$  at the tail of the epididymis, and the percentage of minor defects was  $1.6 \pm 1.21$  in the testis,  $20.4 \pm 11.64$  in the head,  $33.93 \pm 12.54$  in the body and  $52.4 \pm 22, 84$  at the tail of the epididymis. The increase in defects at the tail of the epididymis is related to defects on the tail of the sperm, showing that the environment in this site may affect the morphology thereof. As sperm travel through the epididymis the major defects are decreasing, while the minor are increasing.

Key Words: Sperm, Breeders, Reproductive tract

## INTRODUÇÃO

A algumas décadas atrás, para se conseguir o nascimento de bezerros, só existia uma forma, que era possuir um reprodutor em meio às vacas e novilhas do rebanho. Porém, ao final da Segunda Guerra Mundial, o processo da inseminação artificial em bovinos passou a se desenvolver principalmente na Europa e nos Estados Unidos, devido à questões sanitárias que esses países se encontravam, sobretudo os países europeus. Mesmo com o uso da inseminação se tornando cada vez mais difundido, tendo saltado de 1,5 milhões de doses comercializadas em 1985 para pouco menos de 7 milhões de doses no ano de 2006, essa técnica foi utilizada apenas por 6% do rebanho mundial, segundo dados de 2008. (Alvarez, 2008).

Para Alvarez (2008), o maior obstáculo que impede uma maior difusão da inseminação artificial consiste em realizar mudanças em práticas ineficazes de manejo (especialmente no manejo alimentar), o que é comprovado por índices reprodutivos que estão abaixo do normal. A inseminação pode ser uma alternativa à monta natural quando os problemas com manejo forem resolvidos, ou seja, quando o manejo for satisfatório. Outro fator limitante para adotar a inseminação artificial consiste no fato da mesma exigir mão-de-obra capacitada para inseminar e com disponibilidade para detectar animais em cio, caso não sejam feitos protocolos para inseminar as vacas ao mesmo tempo (técnica conhecida como inseminação artificial a tempo fixo, ou simplesmente, IATF). Esses protocolos geralmente são mais recomendados para rebanhos numerosos, onde a observação de cio passa a ser um pouco mais difícil ou não tão eficaz.

O número de espermatozóides liberados num ejaculado de touro, que é de aproximadamente 5 bilhões, em média, é muito superior em relação as necessidades para ocorrer a fecundação (Alvarez, 2008). Tal processo pode ser realizado com eficiência usando apenas 3 milhões de espermatozóides (pode ser que seja até um número menor do que esse) se forem depositados diretamente no útero da fêmea. Por questões de segurança, o que se vê na prática é que uma dose de sêmen congelado possui cerca de 20 milhões de espermatozóides. Dessa maneira, ao ser diluído em um tampão adequado, um único ejaculado fracionado é capaz de fecundar um bom número de fêmeas (esse número vai depender da concentração espermática do sêmen e da taxa de prenhes das fêmeas). O sêmen, ao ser congelado, conserva sua viabilidade por um bom tempo, o que elimina a necessidade de utilizar sêmen fresco

imediatamente após sua coleta. Basicamente a inseminação artificial traz vantagens decorrentes do melhoramento genético dos rebanhos (o que inclui um incremento qualitativo e quantitativo da produção), que é obtido usando-se touros comprovadamente superiores, além de evitar algumas doenças que podem ser passadas do touro para a fêmea durante a cópula (por exemplo, a brucelose), de acordo com Alvarez (2008).

Silva et al. (2002) fizeram um trabalho a fim de verificar a relação entre circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros Nelore PO. Foi observado que as correlações entre circunferência escrotal e patologias no espermatozóide foram baixas e a maioria negativa. Ou seja, quanto maior a circunferência escrotal do animal, menor a ocorrência de defeitos espermáticos. Portanto, um sêmen de boa qualidade está diretamente correlacionado com algumas das características morfológicas do touro (circunferência escrotal, por exemplo).

Durante um bom tempo, os defeitos dos espermatozoides foram classificados de acordo com a região anatômica afetada dessa célula (cabeça, cauda, peça principal). As causas de defeitos na forma do espermatozóide podem ter origem no testículo ou podem ser ainda extra testiculares. Passou-se então a agrupar as patologias espermáticas de acordo com sua morfologia, seja pela posição anatômica, ou seja, pelo impacto causado na fertilidade, a fim de facilitar para o veterinário a interpretação do quadro geral na avaliação clínica e andrológica dos touros (Freneau, 2011).

Espermatogênese é o processo cronológico que envolve a multiplicação e diferenciação das células germinativas do epitélio seminífero dos testículos que resulta na formação de uma célula que é altamente especializada, o espermatozóide, que é o gameta dos machos. A espermatogênese pode ainda ser dividida em espermatocitogênese e espermiogênese. Espermatocitogênese consiste na proliferação cíclica da população de células tronco de espermatogônias por mitose para a produção de espermatócitos primários, e ao mesmo tempo, renovar seu próprio número para que essa linhagem de células tenha continuidade. Já a meiose vai consistir na formação de espermatócitos secundários e espermatídes haploides a partir dos espermatócitos primários diplóides. Espermiogênese é a fase em que as espermatídes arredondadas sofrem uma metamorfose e viram o espermatozóide, que tem cabeça plana e pequena, com núcleo condensado e vesícula especializada que contém algumas enzimas, além de uma cauda que vai ter a função de motilidade para essa célula. (Brito, 2007).

Para Brito (2007), a forma mais branda de degeneração testicular não produz sinais que possam ser facilmente detectáveis sobre os testículos e se manifesta por aumentar a produção de espermatozóides anormais. Temperatura elevada no escroto e a disfunção endócrina são provavelmente as duas causas mais comuns de degeneração testicular leve. Mudanças na morfologia dos espermatozóides podem se manifestar no ejaculado após certo período de tempo que vai variar segundo o estágio de desenvolvimento das células germinativas no momento da injúria e do tempo que vai ser necessário para que as células defeituosas sejam lançadas nos túbulos seminíferos e serem transportadas através do epidídimo. Cada célula testicular tem sensibilidade diferente à temperatura escrotal elevada e à disfunção endócrina. Segundo o mesmo autor, espermátides e espermátócitos são mais sensíveis, enquanto as espermatogônias e os espermatozóides presentes no epidídimo são um pouco mais resistentes. Se a exposição a uma injúria é limitada, uma sequência de defeitos nos espermatozóides é esperada, ao passo que se a exposição a um insulto é prolongada, uma gama de defeitos espermáticos pode aparecer no ejaculado ao mesmo tempo. A qualidade do sêmen vai melhorar quando as espermatogônias que suportaram o insulto reiniciarem a produção de células morfológicamente normais.

Para Brito (2007), a espermatogênese normal nos mamíferos vai depender da manutenção da temperatura testicular em relação a temperatura corporal, sendo que nos testículos essa temperatura deve ser de 3 a 5°C abaixo da temperatura do corpo.

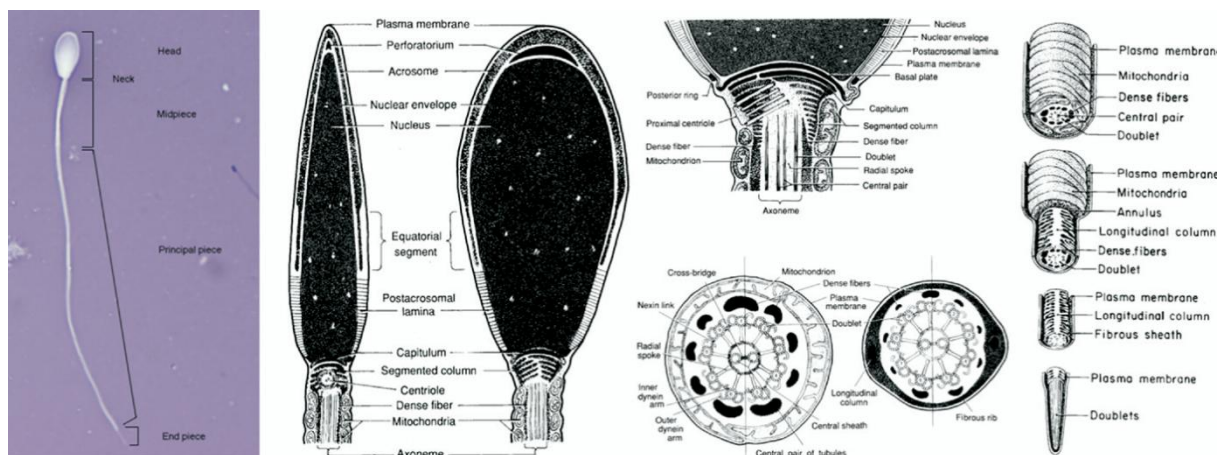
Segundo Hafez (2004) um touro inicia sua vida reprodutiva por volta dos 12 a 14 meses de idade, pesando cerca de 500kg de peso vivo (o que pode variar entre um taurino e um zebuíno, além de variar ainda entre as raças) com um volume de 3 a 5 ml de ejaculado e com concentração espermática que pode variar entre 80 e 120 milhões de espermatozóides por mL, lembrando que esses são números relativos ao início da vida reprodutiva.

Hafez (2004) afirma que nos mamíferos, o hipotálamo secreta gonadotrofina, que é um hormônio liberador de um outro hormônio (GnRH), que vai estimular a secreção de hormônio luteinizante (LH) e de hormônio folículo estimulante (FSH) da adenohipófise. O LH estimula as células intersticiais de Leydig a produzirem andrógenos, sendo que o principal é a testosterona. Os andrógenos são então secretados para dentro da corrente sanguínea, onde irão provocar o desenvolvimento das características sexuais secundárias no indivíduo macho e, também, o desenvolvimento e manutenção do trato reprodutivo masculino. Para esse autor, os andrógenos suprimem a secreção dos hormônios GnRH, LH e FSH por retroalimentação

negativa sobre hipófise e hipotálamo. A testosterona também vai ser secretada dentro dos túbulos seminíferos, onde é indispensável para que ocorra a manutenção da espermatogênese. O FSH vai interagir com os receptores das células de Sertoli para a produção da proteína transportadora de andrógenos (ABP), para a conversão de testosterona em diidrotestosterona e estrogênio, para estimular a espermatocitogênese, para complementar a liberação de espermatozoides (espermição) e secretar a inibina. A inibina que é secretada dentro da corrente sanguínea tem efeito de retroalimentação negativa sobre a secreção do hormônio FSH, porém não sobre o hormônio LH.

O espermatozoide é composto de cabeça, pescoço e cauda e é totalmente recoberto pela membrana plasmática. A cabeça é formada pelo acrossomo que recobre os dois terços anteriores do núcleo dessa célula, a lâmina postacrossomal que recobre o restante do núcleo, e o núcleo que fica recoberto por uma membrana dupla. Pequenos vacúolos nucleares podem ser observados na cromatina condensada, e o *perforatorium* é uma estrutura observada entre o acrossomo e a porção anterior do núcleo do espermatozoide. O espessamento da membrana nuclear consiste na placa basal na base do núcleo, que liga a cabeça ao capitulum do pescoço. No pescoço também podem ser observadas as colunas segmentadas e o centríolo proximal. A cauda por sua vez é dividida em peça média, peça principal e peça final. O axonema é uma estrutura que se estende por todo o comprimento da cauda, e consiste de nove duplas de microtúbulos organizados ao redor de um par de microtúbulos que fica localizado centralmente. Essas duplas são interligadas por ligações de nexina, e o raio central se conecta a elas, sendo que o raio central se interconecta por uma ponte curta. Braços de dineína se projetam de uma dupla de microtúbulos para uma dupla seguinte. Há nove fibras densas externas que cercam o axonema por todo o comprimento nas peças média e principal. O axonema e também as fibras são cercados pela hélice mitocondrial na peça média e por uma bainha fibrosa que é composta por duas colunas longitudinais e nervuras circunferenciais ao longo da peça principal. (Brito, 2007)

Figura 1: Anatomia do espermatozóide, evidenciando as estruturas que compõem a cabeça, o pescoço e a cauda. Fonte: Brito (2007).



Alguns autores usam um sistema de avaliação da morfologia espermática no qual os defeitos são priorizados (geralmente o defeito que é mais proximal) de maneira que apenas um defeito é registrado por gameta. Tal sistema baseia-se numa suposição de que alguns dos defeitos são mais importantes ou podem prejudicar mais a fertilidade do que outros defeitos. É importante ressaltar que é apenas uma suposição, não necessariamente baseada em um dado científico (Brito, 2007).

Brito (2007) comenta sobre um sistema de classificação no qual os defeitos dos espermatozóides são classificados segundo sua origem, sendo que os defeitos primários são aqueles que ocorreram durante a espermatogênese, e os considerados secundários são os que ocorreram durante a passagem pelo epidídimo. Essa classificação é baseada nos estudos de Lagerlof (1934). Para o primeiro autor, as limitações de tal classificação de defeitos são a origem desconhecida de alguns defeitos, além dos defeitos primários não serem necessariamente mais prejudiciais à fertilidade do que os secundários, o que algumas vezes é interpretado erroneamente. Já outro sistema classifica os defeitos em defeitos maiores e defeitos menores segundo a relação do defeito com a fertilidade. (Blom, 1973).

Para Freneau (2011), a morfologia espermática é sem dúvida o fator mais importante na avaliação rotineira de um touro por estar relacionada com a fertilidade. Além disso, a morfologia na vida reprodutiva do animal se relaciona com os quadros de qualidade seminal durante a puberdade e a maturação sexual, como também quando o animal é submetido a algum processo que causa estresse. Para o autor, o método de análise com lâmina úmida em

microscopia de contraste de fase deveria ser o método priorizado, porque proporciona uma melhor observação dos defeitos importantes para o prognóstico do animal, além daqueles relacionados com a fertilização e a formação de um futuro embrião.

Para se analisar a morfologia espermática 200 células devem ser contadas (normais e anormais), relatando um único defeito por célula anormal. Caso seja observado mais de um defeito em uma mesma célula, eles devem ser registrados por ordem de importância, sendo que os defeitos maiores devem ser priorizados em relação aos defeitos menores. Caso sejam observados dois defeitos que tenham uma mesma classificação, apenas o de maior frequência deve ser registrado. (Freneau, 2011).

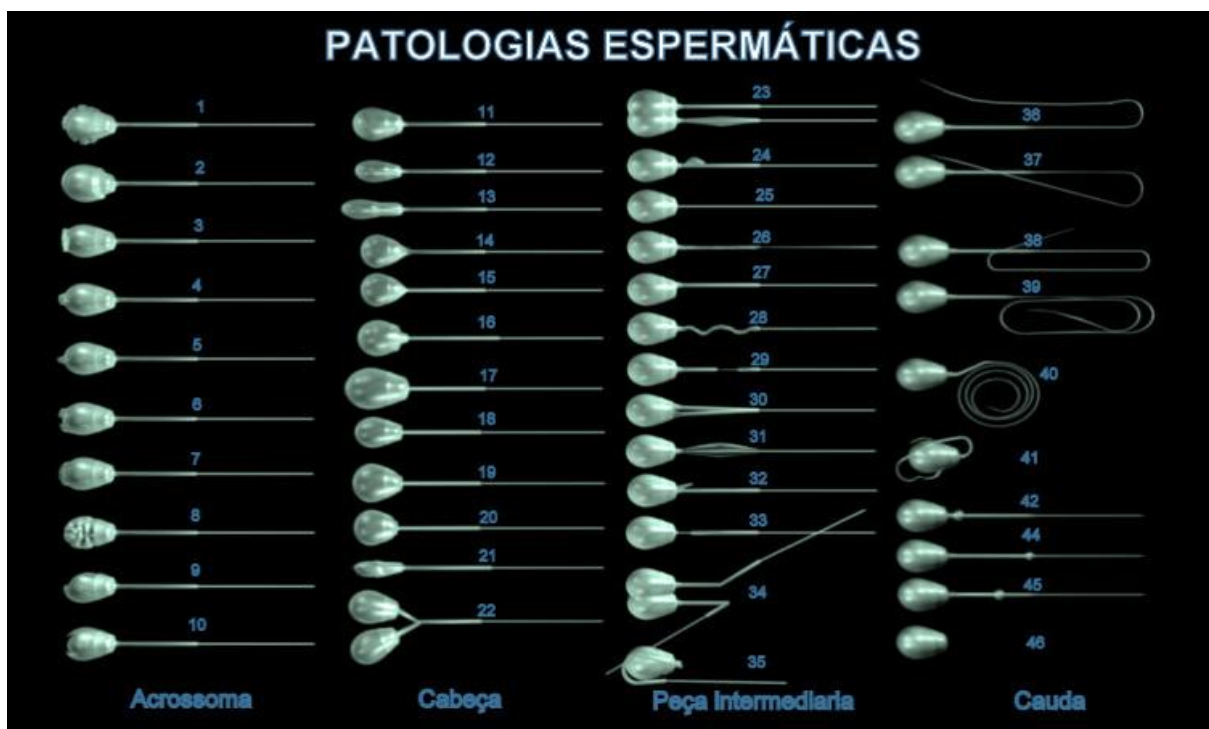
No momento da cópula, o touro deposita bilhões de espermatozoides no fundo da vagina da vaca. Já na inseminação artificial, o sêmen é colocado diretamente no útero, ultrapassando-se a cérvix, o que permite um número reduzido de espermatozoides. Após a inseminação, o sêmen então é exposto a uma série de ambientes diferentes que vão alterar significativamente o número e a função dos espermatozoides. Muitos deles são perdidos no trato genital devido ao movimento retrógrado. Espermatozoides depositados no trato genital da fêmea precisam atravessar o útero, passar para a tuba uterina através da junção útero-tubárica, para só então poder reagir com o epitélio da tuba uterina, a fim de fertilizar o oócito. Para um espermatozoide ser considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que ele possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais. Presença de membranas íntegras no espermatozoide é um pré-requisito para que eventos relacionados ao processo da fertilização, como por exemplo, a capacitação espermática, a penetração nos revestimentos do ovócito, a ligação à zona pelúcida desse ovócito e a fusão com o oolema, possam ocorrer de forma satisfatória (Sartori, 2004).

De acordo com a classificação proposta por Blom (1973) são considerados como defeitos maiores de espermatozoides: grânulo persistente ou *knobbed* (nodoso), destacado e outros, tomando como base o acrossomo; gota citoplasmática proximal; espermatozoide subdesenvolvido; cabeça isolada patológica, cabeça estreita na base; cabeça piriforme; cabeça pequena anormal; contorno anormal; cabeça com vacúolos nucleares (diadema, cratera); formas teratológicas; peça intermediária no formato de saca-rolha, desnuda, fraturada, com edema, peça intermediária rudimentar, pseudogota; cauda fortemente dobrada ou enrolada; cauda enrolada na cabeça; cauda dobrada ou enrolada com gota. Espermatozoides com defeitos menores são aqueles com: gota citoplasmática distal; cabeça delgada; cabeça curta,



larga, gigante ou pequena; cabeça isolada normal; cabeça abaxial, retro axial ou oblíqua; cauda dobrada ou enrolada.

Figura 2. Principais defeitos espermáticos no touro. Legenda: 1-10. Defeitos de acrossoma: 1. Afrouxado; 2. Inchado; 3. Dobrado; 4-7. *Knobbed* (elevado, em ponta, duas pontas, aplainado ou achatado); 8. Enrugado; 9-10. Incompleto. 11-22. Defeitos de cabeça: 11. Normal; 12. Delgada; 13. Alongada; 14-15. Delgada na base; 16. Piriforme; 17 e 19. Grande; 18. Pequena normal; 20. Arredondada ou globosa; 21. Pequena patológica; 22. Cabeças duplas. 23-35. Defeitos de peça intermediária: 23 Grossas; 24. Pseudogota; 25. Filiforme; 26. Mordida; 27. Implantação abaxial; 28. Saca-rolha; 29 e 33. Desassociada ou com aplasia segmentar; 30. Dupla; 31. Dividida; 32. Desdobrada; 34. Quebradas, 35. Dobrada na cabeça. 36-41 Defeitos de Cauda: 36-37. Cauda dobrada simples; 38. Caudas enroladas simples; 39-40. Fortemente enrolada ou dobrada; 41. Cauda e peça intermediária enrolada na cabeça; 42. Gota citoplasmática proximal; 44-45. Gota citoplasmática distal; 46. Cabeça isolada normal ou decapitada. Fonte: Freneau (2011).



Oliveira et al. (2011) realizaram um experimento com o objetivo de se verificar a taxa de recuperação e as características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados. No experimento, após a centrifugação em gradiente de Percoll®, foi observada uma diminuição da porcentagem de defeitos maiores, o que confirmou mais um benefício proporcionado pela metodologia proposta pelos autores, com relação a qualidade de sêmen descongelado. A propriedade que foi atribuída ao Percoll®, de ser capaz de selecionar células melhores, permitiu que células anormais fossem retidas nas frações superiores do gradiente. Porém, foi observado aumento

significativo de defeitos menores após a centrifugação, no processo para sexagem do sêmen. O aumento decorreu-se especialmente em virtude do aumento acentuado no número de cabeças isoladas normais. O aumento de tal alteração espermática é intrigante para os autores, uma vez que o gradiente de Percoll® deveria ter retido as células espermáticas lesionadas, seguindo a tendência dos resultados para os defeitos maiores, onde as células com anormalidades foram retidas.

Para interpretar a morfologia espermática, deve-se considerar para os defeitos maiores os limites de 5% e 20%, para os defeitos maiores individuais e totais, respectivamente. Para os defeitos menores, deve-se considerar 10% para limite de defeitos menores individuais e 25% para totais. Considerando-se defeitos maiores e menores, ou seja, defeitos totais de espermatozoides, o limite é de 30%. Se forem notadas no espermiograma medusas, células primordiais, células gigantes, leucócitos, hemácias ou células epiteliais, todas essas células devem ser consideradas na interpretação do exame. Muitos métodos novos e técnicas de avaliação de capacidade reprodutiva do touro ou do sêmen vem sendo desenvolvidas e envolvem a determinação de algumas proteínas no plasma seminal, a indução da reação acrossômica, uso de ultra-som, uso de termografia, e mais recentemente, o uso de sondas fluorescentes. Mesmo essas técnicas sendo muito pouco empregadas na rotina, elas podem ser utilizadas de maneira complementar para esclarecerem falhas nos processos reprodutivos (Barbosa et al., 2005).

Em estudo realizado por Addad et al. (2009) foram feitas avaliações clínico-andrológicas em touros da Raça Nelore, além de testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas. Os 46 animais utilizados no estudo possuíam idade média de 67,8 meses. Para a avaliação andrológica dos animais foi mensurada a circunferência escrotal. As amostras de sêmen foram coletadas por eletroejaculação. Os autores concluíram ao final do estudo que as características reprodutivas dos touros estiveram dentro de padrões aceitáveis durante os três anos de avaliação. Os defeitos espermáticos, a integridade de acrossoma, a integridade da membrana plasmática e a fragmentação de cromatina nuclear não foram frequentes para causar comprometimento da qualidade do sêmen e do desempenho reprodutivo dos touros. Não foi observada relação entre os defeitos espermáticos e a integridade do acrossomo e/ou fragmentação de cromatina do núcleo.

Silva et al. (2009) verificaram o efeito da idade do touro e da época de colheita de sêmen acerca de características físicas e de morfologia de sêmen de touros *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. As maiores porcentagens de anormalidades totais, em ambas subespécies, foram vistas nos touros mais jovens (com idade entre 12 e 36 meses) e nos mais erados (que estavam na faixa de 109 a 142 meses de idade). Os touros zebuínos mais velhos produziram um sêmen mais concentrado, e, conseqüentemente, maior quantidade média de doses por ejaculado. Nos animais europeus o sêmen, em menor concentração e maiores porcentagens de anormalidades nos espermatozoides, foram verificadas entre os meses de dezembro e fevereiro (verão). Dessa forma, menor quantidade de doses de sêmen por ejaculado foi produzida nos taurinos, que pode ser decorrente do estresse calórico pelo qual esses animais, provavelmente, estavam passando, já que o verão, na maior parte do país, é caracterizado por altas temperaturas acompanhadas de elevada umidade, fatores que sem dúvida são estressantes para taurinos, menos adaptados ao clima brasileiro. Esses pesquisadores afirmam que a idade e a época da colheita influenciam a qualidade seminal de touros doadores de sêmen que são mantidos em regime de colheita para comercialização de sêmen.

Em outra pesquisa similar, Anchieta et al. (2005) analisaram amostras de sêmen e relacionaram com a estação do ano na qual as amostras foram colhidas. Para tais autores, a estação climática pode vir a interferir na qualidade do sêmen de touros doadores em central de inseminação artificial e na eficiência do sêmen para ser congelado. O sêmen dos taurinos foi superior ao dos zebuínos nas características turbilhamento, motilidade e concentração espermática, porém inferior quando foi comparado volume. Descarte de sêmen (inviável para congelamento) foi maior durante a época chuvosa do ano. Sêmen descartado devido à características físicas foi maior em touros de raças zebuínas, ao passo que por aspectos de morfologia foi maior nos de raças taurinas. Adotando congelabilidade, o sêmen dos taurinos foi superior ao dos zebuínos.

Moraes et al. (1998) fizeram um experimento com o objetivo de verificar se o exame andrológico em touros pode apresentar o mesmo resultado entre animais puros de raças taurinas e cruzamentos entre taurinos e zebuínos. Foram comparados dois grupos, um entre as raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé, e o outro entre animais Hereford e Braford. As variáveis mensuradas no exame clínico foram perímetro escrotal, motilidade espermática, intensidade do movimento espermático, porcentagem de espermatozoides normais. Ao fim do

experimento, concluiu-se que os critérios adotados para a classificação de touros para reprodução tem comportamento diferente entre distintos grupos raciais, quando são analisadas raças taurinas puras e raças taurinas cruzadas com zebuínas, apesar de estarem dentro de grupos contemporâneos. Dessa forma, infere-se também que esse aspecto deve ser considerado quando se utiliza o exame andrológico como uma ferramenta para incrementar a fertilidade e a produtividade dos sistemas de produção de gado de corte.

Salvador et al. (2008) avaliaram as características de congelamento do sêmen em touros Nelore jovens e estudaram a associação entre essas avaliações, a fim de localizar marcadores para alta fertilidade e congelabilidade do sêmen. Houve diferenças no perfil andrológico dos animais entre os anos, resultando no sucesso da congelamento do sêmen. Foram estimadas correlações significativas entre o volume ejaculado e a motilidade espermática (positiva), volume ejaculado e defeitos espermáticos totais (negativa), e entre volume ejaculado e padrão de recuperação espermática (negativa), entre outras correlações. Para os autores, em touros Nelore jovens, a seleção andrológica tradicional é considerada insuficiente para prever o desempenho na congelamento do sêmen, mas é certo que características como peso corporal, formato dos testículos, idade, concentração espermática, volume ejaculado total, e motilidade espermática podem influenciar no processo de congelamento. É recomendado utilizar testes de congelamento do sêmen para touros jovens selecionados pela capacidade andrológica por pontos como sendo um critério seletivo de animais com alto potencial genético para posteriormente serem utilizados em centrais de produção e de processamento de sêmen.

Em um estudo feito por Freneau et al. (2006), foram utilizados 23 touros Nelore entre 10 e 20 meses de idade, para ser caracterizado o desenvolvimento puberal. Os animais foram criados extensivamente se alimentando de pasto e também receberam suplementação mineral. A cada duas ou quatro semanas foram feitas coletas de dados como medida de peso corporal, circunferência torácica, comprimento e largura dos testículos e circunferência da bolsa escrotal. Os ejaculados foram colhidos por eletroejaculação e foram avaliados quanto a aspectos físicos e morfológicos. Na colheita do sêmen foram mensuradas a porcentagem de desprendimento entre pênis e prepúcio e determinadas as idades médias ao aparecimento dos primeiros espermatozóides e dos primeiros espermatozóides móveis no ejaculado, assim como a puberdade seminal. Foram estabelecidos também os índices de capacidade andrológica por pontos. As idades médias desses touros foram de 13,1 meses para aparecimento dos primeiros espermatozóides, 13,6 meses para aparecimento dos primeiros espermatozóides móveis no

ejaculado, 14,8 meses para puberdade seminal, sendo que aos 16 meses de idade, 91,4%, 82,6%, 73,9% dos animais apresentavam essas três características, respectivamente. A idade média de despendimento total entre pênis e prepúcio foi de 18,1 meses. Correlação positiva foi observada entre a idade dos touros e as características de crescimento corporal, testicular, aspectos físicos dos ejaculados e correlação negativa foi observada entre a idade dos animais e a ocorrência de defeitos nos espermatozóides. Correlação negativa foi observada entre a idade dos animais e a pontuação para circunferência escrotal no índice de capacidade andrológica por pontos à puberdade. Touros Nelore criados a pasto manifestam a puberdade precocemente antes de completarem 15 meses de idade. Desde o aparecimento de espermatozóides no ejaculado até a puberdade seminal, decorreu um período de 51 dias. A puberdade foi mais precoce nos animais jovens com maiores testículos.

Rossi et al. (2009) realizaram um estudo com touros compostos Red Norte (Nelore x Tabapuã x Red Angus x Senepol), focando nas características andrológicas e do sêmen. A idade média dos animais era de 13,9 meses, e o objetivo principal do estudo era estimar o advento da puberdade e a qualidade do sêmen desses animais. Foram mensurados o perímetro escrotal, o peso e as características do sêmen de 70 tourinhos. Os animais foram divididos em três grupos, sendo que no primeiro grupo foram encaixados os animais com perímetro escrotal entre 27 e 33 centímetros (24 animais), os do segundo grupo tinham perímetro entre 33 e 35 centímetros (24 animais), e os designados para o terceiro grupo possuíam entre 35 e 43 centímetros de perímetro escrotal (22 animais). No espermiograma, a prevalência de defeitos totais foi de  $81,4 \pm 15,9\%$ ,  $73,8 \pm 15,4\%$  e  $67,9 \pm 19,0\%$ , respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3. Em relação a defeitos maiores, foram observados  $87,3 \pm 26,2\%$ ,  $66,8 \pm 24,9\%$  e  $56,7 \pm 17,1\%$ , e se tratando de defeitos menores,  $16,6 \pm 14,9\%$ ,  $33,2 \pm 24,9\%$  e  $43,3 \pm 17,1\%$ , para os grupos 1, 2 e 3 respectivamente. Desses 70 animais analisados, somente sete foram considerados aptos para a reprodução (10% do total). Estes dados mostram o quanto é importante a avaliação andrológica e o perímetro escrotal, que são usados como critério de seleção para precocidade sexual em bovinos, usados em programas de seleção e de melhoramento genético. Em função da avaliação das características do sêmen e do desenvolvimento dos testículos, os animais desse estudo se encontravam em fase de transição da fase de imaturidade sexual para a puberdade. Os resultados também demonstraram que patologias no espermatozóide diminuem a medida que aumenta o período escrotal.

Por ser uma célula de relativa complexidade, o espermatozóide fica impossibilitado de fertilizar um ovócito quando um dos seus fatores bioquímicos ou de sua morfologia é afetado. Avaliando-se um único aspecto, a normalidade do outro não pode ser garantida. Por isso, é importante avaliar mais de um aspecto, porque o diagnóstico da função e da integridade do espermatozóide fica mais apropriado dessa maneira. Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática (como número total de espermatozóides móveis, motilidade progressiva, morfologia dos espermatozóides) se mostraram limitados em relação a capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. A realização de somente um teste se mostra pouco eficaz pelo fato de cada espermatozóide apresentar múltiplos compartimentos subcelulares, com funções diferentes para serem avaliadas. Assim, alguns testes complementares podem ser realizados, como o teste de termorresistência, o teste hiposmótico, e o teste de reação acrossômica. (Siqueira et al., 2007)

Para Freneau (2011), as principais motivações econômicas e biológicas para se avaliar a qualidade dos espermatozóides são fazer a identificação de touros com probabilidade alta de ter fertilidade reduzida ou então observar se essa fertilidade reduzida poderia diminuir ou aumentar. Com a associação dos conhecimentos sobre patologia e fisiologia, e o histórico do touro com os resultados da avaliação clínica (quando possível), os veterinários procuram estabelecer o grau de interferência dos defeitos espermáticos na fertilidade do touro. A avaliação da morfologia espermática, adotada como um procedimento simples, adquire elevada importância para prognosticar possíveis mudanças de quadros específicos, de tratamentos clínicos ou mesmo para acompanhar o desenvolvimento reprodutivo de touros jovens. Dessa forma, é muito importante que os veterinários compreendam o processo da espermatogênese e a patogênese dos defeitos espermáticos. Um exemplo para ilustrar tal situação seria uma degeneração testicular muito leve que não produz sinais clínicos perceptíveis nos testículos do animal, mas se manifesta quase que unicamente pelo aumento na produção de espermatozóides defeituosos.

Para avaliações rotineiras das características morfológicas dos espermatozóides, podem ser utilizadas duas técnicas principais: esfregaços corados em microscópio de campo claro e preparação úmida com microscópio de contraste de fase. Além dessas duas técnicas, já existem também sistemas automatizados que, além de analisar aspectos físicos como motilidade espermática e concentração, também são capazes de realizar análises de morfologia espermática. Estudos recentes que compararam a morfologia espermática de

ejaculados dos mesmos animais com duas técnicas distintas, lâmina úmida e contraste diferencial de interferência de fase, e esfregaços corados com eosina-nigrosina, chegaram a conclusão que os defeitos totais tiveram mesma proporção, embora diferenças significativas tenham ocorrido entre as proporções de defeitos maiores e menores (Freneau et al., 2010).

De uma maneira geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados, usando-se corantes como Wright, Rosa de Bengala, Giemsa, eosina-nigrosina, Karras, além de outros, ou então através da técnica da câmara úmida. Como o espermatozóide é uma célula translúcida, visualizar tal célula em microscopia óptica comum não deixa a imagem muito nítida para avaliar o contorno celular, portanto, quando se dispõe somente de microscopia óptica comum, deve-se usar a técnica de esfregaço corado. A técnica da câmara úmida, onde os espermatozóides não são corados, deve ser feita usando microscopia capaz de destacar os contornos celulares, como a microscopia de contraste de fase ou a microscopia de contraste de interferência diferencial (CBRA, 1998)

Alguns touros apresentam defeitos espermáticos individuais com uma frequência elevada que não mudam mesmo com o passar do tempo. Em tais casos, foi observada transmissão genética em algumas raças e/ou famílias de touros. De forma básica, podem ser defeitos maiores ou primários, com frequência aproximada de 10 a 20 por cento dos espermatozóides, que podem manter frequência similar ao longo do tempo, e em muitas das vezes, podem estar associados com fertilidade reduzida ou até mesmo esterilidade, e o principal, eles são defeitos de caráter herdável. Nos defeitos espermáticos onde foi verificada a forma de transmissão genética, esses defeitos provém de genes autossômicos recessivos, que podem ou não estarem ligados ao sexo. Os principais defeitos espermáticos genéticos de acrossoma são: *knobbed*, acrossoma incompleto e rugoso. Com relação a cabeça, os principais são: condensação anormal, cabeças isoladas, combinação de cabeças gigantes com crista nuclear. Os defeitos de peça intermediária são: defeito Dag, saca-rolha ou zigue-zague e pseudogota. Em relação a cauda, o principal defeito é a cauda em toco. (Freneau, 2011)

Segundo Freitas-Dell'Aqua et al. (2009), como os espermatozóides representam células complexas e que dependem de um bom funcionamento de suas estruturas para exercerem seu papel natural na reprodução, podem ocorrer falhas nos métodos tradicionais de avaliação espermática, sendo observado, geralmente, correlações baixas ou variações entre os padrões de qualidade das amostras de sêmen avaliadas em laboratório e os índices de fertilidade alcançados nos programas de inseminação artificial em bovinos. Para esses autores,

a descoberta de uma variedade de fluorocromos conjugados e compostos a base de sondas fluorescentes permitem uma análise mais ampla das características dos espermatozoides, e juntamente com a citometria de fluxo, permitem avaliar um grande número dessas células. A vantagem mais importante é poder analisar milhares de células em poucos segundos, agregando maior repetibilidade às avaliações. Um maior entendimento da qualidade espermática em amostras seminais é de fundamental importância para que num futuro próximo as avaliações *in vitro* possam fazer de forma mais segura uma projeção das expectativas de fertilidade com a sua aplicação nos testes feitos a campo.

Para Matos et al. (2008), tem sido rápido nos últimos anos o desenvolvimento de equipamentos e procedimentos para facilitar a análise automatizada de espermatozoides. Sistemas automáticos de análise seminal (CASA) permitem uma mensuração objetiva de diferentes características do espermatozoide, mostrando alto nível de precisão e segurança, sendo utilizado atualmente como uma ferramenta para ajudar a melhorar o conhecimento e a habilidade para a manipulação de espermatozoides, eliminando a subjetividade das análises feitas através do método convencional. Uma futura uniformização e padronização desse instrumento permitirão a oportunidade de analisar, de forma objetiva, os resultados de motilidade e morfometria dos espermatozoides, definindo de forma universal valores aceitos como normais e dando subsídio para uma melhor aplicação das biotécnicas da reprodução.

Dias et al. (2008) mostraram em um estudo que as correlações genéticas favoráveis entre circunferência escrotal e características físicas e morfológicas do sêmen, além da correlação genética de magnitude alta entre circunferência escrotal e peso, são uma boa indicação de que a circunferência escrotal é um parâmetro adequado e pode ser usada como um critério de seleção em programas de melhoramento genético, visando um maior crescimento corporal e uma melhor fertilidade. As correlações genéticas favoráveis e magnitude moderada a elevada entre o índice de classificação andrológica por pontos e peso, circunferência escrotal, defeitos maiores e defeitos totais nos espermatozoides são uma indicação de que tal índice pode ser usado como um critério de seleção de touros da raça Nelore.

De acordo com pesquisa realizada por Silveira et al. (2010), touros da raça Nelore são considerados sexualmente maduros entre 20 e 22 meses de idade, onde a porcentagem de defeitos espermáticos maiores é de 10%, e a de defeitos espermáticos menores é de 20%. Ainda de acordo com a pesquisa dos autores, o perímetro escrotal e o volume testicular estão



correlacionados positivamente a todas as características de biometria testicular e aspectos físicos e de morfologia do ejaculado. Ao analisar espermatozóides de touros Nelore mestiços, Silva et al. (2003) verificaram que os espermatozóides do epidídimo apresentaram taxa de defeitos menores e totais maiores que a dos espermatozóides do ejaculado. As diferenças foram significativas, e isso mostra que os espermatozóides têm maior qualidade (menos defeitos) à medida que vão avançando no trato reprodutivo, encaminhando para serem ejaculados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A análise dos espermatozóides foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, no período de maio a julho de 2013. Foram analisadas amostras de sêmen coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos (cabeça, corpo e cauda), a fim de se verificar a morfologia dos espermatozóides. As amostras foram coletadas de 15 touros de três raças (Nelore, Curraleiro e Pantaneiro, cinco de cada), após o abate desses animais em frigorífico. A idade média dos animais era de  $24 \pm 2$  meses (os touros tinham entre 22 e 27 meses de idade).

Na avaliação das características morfológicas dos espermatozóides, a técnica escolhida foi a preparação úmida com microscópio de contraste de fase, uma vez que tal técnica permite uma melhor observação de defeitos nos espermatozóides (Freneau et al., 2010).

Os defeitos foram agrupados de acordo com a região do espermatozóide que estava sendo afetada: cabeça, pescoço ou cauda. Em um frasco contendo solução formol-salina tamponada (1mL) foram depositadas algumas gotas das amostras, até a obtenção de um aspecto ligeiramente turvo. O frasco foi previamente aquecido a temperatura de 37 °C. A amostra foi preservada a uma temperatura de 5°C, e foi feita suspensão das células periodicamente por meio de leve agitação até a realização do exame, uma vez que isso tende a evitar que ocorra aglutinação espermática. A montagem da preparação úmida é baseada na colocação de uma gota da solução preparada anteriormente sobre uma lâmina limpa e seca, cobrindo-a imediatamente após com uma lamínula. Aplicou-se então sobre esse conjunto papel filtro, pressionando de forma suave a lamínula até que o excesso de líquido foi absorvido, e a lamínula foi fixada posteriormente com esmalte. A lâmina foi levada então a um microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000 vezes. Para a contagem dos

defeitos, foram observadas 200 células no microscópio, e somente o defeito considerado de maior importância foi anotado por cada célula analisada. Após a contagem, estimou-se a porcentagem de ocorrência de cada defeito com base nas 200 células que foram analisadas (CBRA, 1998).

Foram comparados os defeitos maiores e menores entre as diferentes raças por meio do teste T (significância  $P < 0,05$ ), que foi executado no programa Microsoft Excel, assim como as gotas citoplasmáticas proximais e distais em cada raça.

## RESULTADOS

Após a leitura das amostras em laboratório, foram anotados todos os defeitos encontrados em cada uma das quatro partes do trato genital de cada touro (testículo, cabeça, corpo e cauda do epidídimo), resultando num total de 60 amostras analisadas (4 amostras por touro, num total de 15 touros). Os defeitos foram agrupados em defeitos maiores ou defeitos menores.

Após a soma, foram calculados a média e o desvio-padrão dos defeitos maiores e menores por parte do trato reprodutivo de cada uma das três raças (Tabela 1).

Tabela 1. Média (em porcentagem) e desvio-padrão, dos defeitos espermáticos por raça.

Raça	MA	me	MA	me	MA	me	MA	me
	Test	Test	Ecab	Ecab	Ecor	Ecor	Ecau	Ecau
Curraleiro	59,6±	2,6±	55,4±	25±	16,4±	33,2±	19,8±	52,8±
	7,89	1,81	19,95	22,19	10,99	13,73	14,42	26,98
Nelore	72±	1,6±	65,4±	18,8±	11,2±	36,8±	14,2±	59±
	4,18	1,51	25,32	19,37	5,35	9,54	5,71	16,1
Pantaneiro	59,8±	0,6±	55,8±	17,4±	8,6±	31,8±	8,6±	45,4±
	11,34	0,54	12,96	18,42	7,02	22,07	10,18	25,54
Geral(X)	63,8±	1,6±	58,86±	20,4±	12,06±	33,93±	14,2±	52,4±
	7,8	1,29	19,41	19,99	7,78	15,11	10,11	22,87

MA Test = defeitos maiores no testículo; MA Ecab = defeitos maiores na cabeça do epidídimo; MA Ecor = defeitos maiores no corpo do epidídimo; MA Ecau = defeitos maiores na cauda do epidídimo; me Test = defeitos menores no testículo; me Ecab = defeitos menores na cabeça do epidídimo; me Ecor = defeitos menores no corpo do epidídimo; me Ecau = defeitos menores na cauda do epidídimo.

A fim de comparar as três raças entre si, os defeitos foram agrupados em maiores e menores (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio-padrão, em porcentagem, dos espermatozóides normais, defeitos maiores e menores separados por raça.

Raça	Normais	MA	me	Total de defeitos
Curraleiro	33,80±5,27 <sup>a</sup>	37,80±7,08 <sup>a</sup>	28,40±9,59 <sup>a</sup>	66,20
Nelore	30,25±4,49 <sup>a</sup>	40,70±5,77 <sup>a</sup>	29,05±6,01 <sup>a</sup>	69,75
Pantaneiro	43,00±5,69 <sup>b</sup>	33,20±5,35 <sup>b</sup>	23,80±11,48 <sup>a</sup>	57,00

MA = defeitos maiores; me = defeitos menores. Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística.

A Tabela 3 mostra a porcentagem de espermatozóides com gota citoplasmática proximal e distal em cada uma das raças, que foram os defeitos mais encontrados durante as análises.

Tabela 3. Porcentagem de espermatozóides com gota citoplasmática proximal e distal em cada raça.

Raça	G C P	G C D	Total de gotas
Curraleiro	29,15 <sup>a</sup>	23,8 <sup>a</sup>	52,95
Nelore	34,15 <sup>b</sup>	25,8 <sup>a</sup>	59,95
Pantaneiro	28,05 <sup>a</sup>	21,2 <sup>a</sup>	49,25

G C P = gota citoplasmática proximal; G C D = gota citoplasmática distal. Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística.

## DISCUSSÃO

Para Freneau (2011), a morfologia espermática é sem dúvida o fator mais importante na avaliação rotineira de um touro por estar relacionada com a fertilidade. Além disso, a

morfologia na vida reprodutiva do animal se relaciona com a qualidade seminal durante a puberdade e a maturação sexual, como também quando o animal é submetido a algum processo que causa estresse. Para o autor, o método de análise com lâmina úmida em microscopia de contraste de fase deveria ser o método priorizado, porque proporciona uma melhor observação dos defeitos importantes para o prognóstico do animal, além daqueles relacionados com a fertilização e a formação de um futuro embrião.

Em estudo realizado por Addad et al. (2009) foram feitas avaliações clínico-andrológicas de 46 touros da Raça Nelore (idade média de 67,8 meses), além de testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas. As amostras de sêmen foram coletadas por eletroejaculação. Os autores concluíram que as características reprodutivas dos touros estiveram dentro de padrões aceitáveis durante os três anos de avaliação. Os defeitos espermáticos, a integridade de acrossoma, a integridade da membrana plasmática e a fragmentação de cromatina nuclear não foram frequentes para causar comprometimento da qualidade do sêmen e do desempenho reprodutivo dos touros. Não foi observada relação entre os defeitos espermáticos e a integridade do acrossomo e/ou fragmentação de cromatina do núcleo.

Silva et al. (2009) verificaram o efeito da idade do touro e da época de colheita de sêmen acerca de características físicas e de morfologia de sêmen de touros *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. As maiores porcentagens de anormalidades totais, em ambas as subespécies, foram vistas nos touros mais jovens (com idade entre 12 e 36 meses) e nos mais erados (109 a 142 meses de idade). Os touros zebuínos mais velhos produziram um sêmen mais concentrado, e, conseqüentemente, maior quantidade média de doses por ejaculado. Esses autores observaram também que, nos animais europeus, sêmen com menor concentração e maior porcentagem de anormalidades nos espermatozóides nos meses de dezembro e fevereiro (verão). Dessa forma, menor quantidade de doses de sêmen por ejaculado foi produzida nos taurinos, o que pode ser decorrente do estresse calórico pelo qual esses animais provavelmente estavam passando, já que o verão, na maior parte do país, é caracterizado por altas temperaturas acompanhadas de elevada umidade, fatores que sem dúvida são estressantes para taurinos, menos adaptados ao clima brasileiro. Esses pesquisadores afirmam que a idade e a época da colheita influenciam a qualidade seminal de touros doadores de sêmen.

De acordo com Silveira et al. (2010), touros da raça Nelore são considerados sexualmente maduros entre 20 e 22 meses de idade, onde a porcentagem de defeitos espermáticos maiores é de 10% e a de defeitos menores é de 20%. Ainda de acordo com os autores, o perímetro escrotal e o volume testicular estão correlacionados, positivamente, a todas as características de biometria testicular e aspectos físicos e de morfologia do ejaculado.

Ao analisar espermatozóides de touros Nelore mestiços, Silva et al. (2003) verificaram que os espermatozóides do epidídimo apresentaram taxa de defeitos menores e totais em maiores quantidades do que a dos espermatozóides do ejaculado. As diferenças foram significativas, e isso mostra que os espermatozóides têm maior qualidade (menos defeitos) à medida que vão avançando no trato reprodutivo, encaminhando para serem ejaculados.

Quando foram analisados na cauda do epidídimo, os espermatozóides apresentaram elevado número de defeitos espermáticos menores. Em pesquisa feita por Silva et al. (2003), defeitos menores também foram observados em espermatozóides. Os defeitos mais observados foram os de cauda. Dos Anjos (2006) também verificou um aumento no número de espermatozóides com cauda dobrada, cabeças isoladas e gota citoplasmática proximal, quando os coletou na cauda do epidídimo. Para o último autor, isto pode ter ocorrido devido a níveis anormais de sódio no plasma epididimário, altos níveis de estrogênio e a consequente mudança do meio epididimário.

Neste trabalho, a porcentagem de espermatozóides normais observada na cauda do epidídimo foi de 33,4% (porcentagem média para as três raças analisadas). Barbosa et al. (2012), ao avaliarem a viabilidade de sêmen congelado obtido da cauda do epidídimo de touros post-mortem, verificou média de 66,8 % e 62,7 % de espermatozóides normais para sêmen fresco e congelado, respectivamente. Essa diferença pode ser explicada pelo método de coleta nos epidídimos, já que nesse trabalho a coleta foi feita por aspiração com seringa e agulha, enquanto que Barbosa et al. (2012) utilizaram a técnica de fluxo retrógrado.

Nesta pesquisa, foi observado que o número de espermatozóides com gota citoplasmática proximal foi diminuindo à medida que eles migravam pelo epidídimo. Tal fato também foi observado por Horn et al. (2002). Em ambos os trabalhos, os defeitos espermáticos totais também diminuiram gradativamente. A maturação espermática é a explicação para a diminuição gradativa dessa patologia à medida que os espermatozóides seguem em direção à cauda do epidídimo.

## CONCLUSÃO

À medida que os espermatozóides se deslocavam pelo epidídimo, os defeitos maiores foram diminuindo, gradativamente, ao passo que os defeitos menores foram aumentando em direção à cauda do epidídimo. Este fato deve-se à mudança de localização da gota citoplasmática proximal (defeito maior) para a posição de gota citoplasmática distal (defeito menor).

## REFERÊNCIAS

- ADDAD, R. O.; FRENEAU, G. E.; RESENDE, L. C.; SILVA, L. M. Avaliação Clínico-Andrológica em touros Nelore e testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1044-1054, 2009.
- ALVAREZ, R.H. Considerações sobre o uso da inseminação artificial em bovinos. 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Inseminacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Inseminacao/index.htm)>. Acesso em: 29/09/2013.
- ANCHIETA, M. C.; VALE FILHO, V. R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I. B. M.; ANDRADE, V. J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 2, p. 196-204, 2005.
- BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGASMACHI, M. A. C. M. A importância do exame andrológico em bovinos. *Circular Técnica EMBRAPA*, n. 41, p. 1-13, Dezembro 2005.
- BARBOSA, L. M., KANAZAWA, M. Y., PERES, A. R., SOUZA, F. F. Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros post-mortem. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 11, Suplemento 1, p. 14, 2012.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, v. 25, p. 383-391, 1973.
- BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

DIAS, J. C.; ANDRADE, V. J.; MARTINS, J. A. M.; EMERICK, L. L.; VALE FILHO, V. R. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 53-59, Janeiro 2008.

DOS ANJOS, J. E. A. B. Reprodução em Bovinos. 2006. 54f. Monografia - Departamento de Medicina Veterinária, UPIS Faculdades Integradas, Brasília, 2006.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; CRESPILO, A. M.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, n. 4, p. 213-222, 2009.

FRENEAU, G. E.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; MARIA, W. S. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n.6, p. 1107-1115, 2006.

FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 176-181, 2010.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 160-170, 2011.

HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HORN, M. M., MORAES, J. C. F., EDELWEISS, M. I. A. Evidência de seleção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogênese. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 97, p. 171-174, 2002.

LAGERLOF, N. Morphologische Untersuchungen über Veranderim spermabild und in den Hoden bei Bulle mit Verminderter oder auf gehobe ver Fertilitat. *Acta Pathologica Microbiologia et Immunologica Scandinavica*, v.1, p.254, 1934.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MORAES, J. C. F.; HORN, M. M.; ROSADO JÚNIOR, A. G. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. *Ciência Rural*, v. 28, n. 4, p. 647-652, 1998.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 1, p. 41-48, 2011.

ROSSI, R. O. D. S.; BARRETO FILHO, J. B.; CARVALHO, P. H. A.; LOPES, E.; GONÇALVEZ, T. M. Características andrológicas e do sêmen de touros do composto Red Norte (Nelore x Tabapuã x Red Angus x Senepol), *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 6, p. 1297-1301, 2009.

SALVADOR, D. F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V. R.; DIAS, J. C.; NOGUEIRA, L. A. G. Associação entre o perfil andrológico e a congelamento de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP), *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 3, p. 587-593, 2008.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 35-50, 2004.

SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; CORDEIRO, C. M. T.; FREITAS, A. R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SILVA, A. E. D. F.; DIAS, A. L.; UNANIAN, M. M.; FREITAS, A. R.; BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 6, p. 1890-1900, 2003.

SILVA, A. R.; FERRAUDO, A. S.; PERECIN, D.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Efeito da idade do touro e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças européias e zebuínas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 7, p. 1218-1222, 2009.

SILVEIRA, T. S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; RÊGO DE PAULA, T. A.; MIRANDA NETO, T.; GUIMARÃES, J. D. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 3, p. 503-511, 2010.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. B.; SILVEIRA, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.