

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

LUIZ JERÔNIMO FERREIRA GRUPPI

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DE CROMATINA ESPERMÁTICA E  
MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES DE TOUROS  
ZEBUÍNOS E TAURINOS DURANTE ESTAÇÃO QUENTE E FRIA NA  
MICRORREGIÃO DE UBERABA, MG, BRASIL

Uberlândia  
2019

LUIZ JERÔNIMO FERREIRA GRUPPI

AVALIAÇÃO DA COMPACTAÇÃO DE CROMATINA ESPERMÁTICA E  
MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS  
ZEBUÍNOS E TAURINOS DURANTE ESTAÇÃO QUENTE E FRIA NA  
MICRORREGIÃO DE UBERABA, MG, BRASIL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Uberlândia  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G892a      Gruppi, Luiz Jerônimo Ferreira, 1992  
2019      Avaliação da compactação de cromatina espermática e morfometria da cabeça de espermatozoides de touros zebuínos e taurinos durante estação quente e fria na microrregião de Uberaba, MG, Brasil [recurso eletrônico] / Luiz Jerônimo Ferreira Gruppi. - 2019.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1364>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Sêmen. 3. Cromatina. 4. Reprodução animal. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas			
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico número 007/2019, do PPGBC			
Data:	30/08/2019	Hora de início:	09:00	Hora de encer
Matrícula do Discente:	11712BCE004			
Nome do Discente:	Luiz Jerônimo Ferreira Gruppi			
Título do Trabalho:	Avaliação da compactação da cromatina espermática de touros zebuínos e taurinos durante microregião de Uberaba, MG, Brasil			
Área de concentração:	Biologia Celular			
Linha de pesquisa:	Biologia da Reprodução			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da compactação da cromatina espermática de touros zebuínos e taurinos dur fria na microregião de Uberaba, MG, Brasil			

Reuniu-se no Laboratório de Práticas Virtuais, Sala 2A112, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Marcos de Lucca Moreira Gomes – UFTM; Neide Maria da Silva – UFU e Marcelo Emílio Beletti** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). **Marcelo Emílio Beletti**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2019, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2019, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Lucca Moreira Gomes, Usuário Externo**, em 30/08/2019, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1442883** e o código CRC **F453B2E4**.

---

*Aos meus pais José Luiz e Oraida, e irmão Luiz Fernando!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sempre guiar meu caminho, com saúde e fé para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais e familiares pelo apoio e incentivo aos estudos.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Emilio Beletti por todos os ensinamentos, auxílios e paciência ao longo desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução (ICBIM - UFU), Amanda, Luiza, Miller, Luana e Savio por toda ajuda, parceria e companheirismo.

Ao Professor Dr. Marcos Gomes e Técnica Ligia pela disponibilidade e ajuda nos laboratórios da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Aos colaboradores da Central ABS, em especial Fernando Vilela e Gesualdo, por disponibilizarem material para esse estudo.

E a todos os amigos que participaram diretamente ou indiretamente dessa conquista, em especial ao Rodolfo Miranda por todo o suporte e ajuda em Uberlândia.

*“Há um grande desejo em mim de sempre melhorar.”*  
*Ayrton Senna*



## RESUMO

Evidências sugerem prejuízos no desempenho reprodutivo de touros causados pelo estresse calórico, sendo que touros zebuínos são considerados mais resistentes a este tipo de estresse. No entanto, não se sabe se o manejo correto de touros pode minimizar este efeito deletério durante períodos mais quentes do ano. Objetiva-se com o presente trabalho comparar a qualidade de doses de sêmen de touros zebuínos e taurinos produzidos no inverno e no verão na microrregião de Uberaba, MG, Brasil. As amostras foram avaliadas quanto à concentração, motilidade, morfologia dos espermatozoides, morfometria da cabeça dos espermatozoides, descompactação e heterogeneidade médias da cromatina espermática e quanto a localização da descompactação da cromatina espermática. As avaliações de concentração, motilidade e morfologia foram realizadas conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. As avaliações morfométricas e da cromatina espermática foram feitas utilizando técnicas de análises computacionais de imagens de esfregaços de sêmen, hidrolisados com ácido clorídrico e corados com azul de toluidina. As análises morfométricas demonstraram que em taurinos as células possuem área maior em doses produzidas no verão do que no inverno. Quando comparada à morfometria das doses entre zebuínos e taurinos, independente da estação, os taurinos demonstraram área maior em suas células, em comparação aos touros zebuínos. A harmônica 2 da transformada de Fourier, simetria latero-lateral, descompactação e heterogeneidade da cromatina também foram maiores no grupo de taurinos. Ao comparar a região da cabeça com descompactação de cromatina, o grupo de taurinos apresentou maior número de células normais (sem alterações de cromatina) durante o verão e maior descompactação na metade basal (DMB) das cabeças durante o inverno. DMB também foi maior no grupo de taurinos quando comparados com os zebuínos, sem levar em conta a estação do ano. Quando comparado todas as doses produzidas no verão com o inverno sem levar em consideração a raça, as doses do inverno apresentaram maior número de DMB. Ao comparar a morfologia, as doses produzidas no inverno, independente da raça, apresentaram maior número de células com morfologia normal do que nas doses do verão, que apresentaram maior número de defeitos menores. As doses de touros zebuínos apresentaram uma tendência de maior concentração durante o verão do que no inverno. Já quando comparadas todas as doses, independente da raça, as de verão apresentaram maior concentração do que as doses do inverno. Em geral não houve muitas diferenças entre as doses produzidas durante o inverno e o verão, independente das raças. Essas poucas diferenças podem estar ligadas ao manejo dos touros na central em que as doses foram produzidas. O sombreamento dos piquetes e banhos frequentes

dos animais durante os dias quentes podem ter amenizado as interferências do estresse térmico nesses animais, uniformizando a qualidade das doses durante o ano.

**Palavras-chave:** Sêmen. Cromatina. Azul da toluidina.

## ABSTRACT

Evidences suggests impaired reproductive performance of bulls caused by caloric stress, and *Bos taurus indicus* bulls are considered more resistant to this type of stress. However, it is not known whether correct management of bulls can minimize this deleterious effect during warmer periods of the year. The objective of the present study was to compare the quality of sêmen's strows of *B. taurus* and *B. indicus* produced in winter and summer in the microregion of Uberaba, MG, Brazil. Samples were evaluated for sperm concentration, motility, sperm morphology, sperm head morphometry, decondensation and heterogeneity of sperm chromatin and the location of sperm chromatin decondensation. Concentration, motility and morphology assessments were performed as recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction. Morphometric and sperm chromatin evaluations were performed using computational image analysis techniques of semen hydrolyzed with hydrochloric acid and stained with toluidine blue. The morphometric analyzes showed that in *B. taurus* the cells have larger area in strows produced in summer than in winter. When compared the morphometry of the doses between *B. indicus* and *B.taurus*, regardless of the season, the taurines showed larger area in their cells, compared to the *zebu* bulls. Fourier transform harmonic 2, side symmetry, decondensation and chromatin heterogeneity were also higher in the *B. taurus* group. When comparing the head region with chromatin decondensation, the *B. tourus* group presented higher number of normal cells (without chromatin changes) during the summer and higher decondensation in the basal half (DMB) of the heads during the winter. DMB was also higher in the *B. taurus* group compared to *B. indicus*, regardless of the season. And when compared all doses produced in summer with winter without considering clattle, winter doses showed higher number of DMB. When comparing the morphology, the strows produced in winter, regardless of race, presented higher number of cells with normal morphology than in summer doses, which presented higher number of minor defects. *B. indicus*'s strows tended to be more concentrated during summer than in winter. When compared all doses, regardless of cattle, summer presented higher concentration than strows produced during winter. In general there were not many differences between the strows produced during winter and summer, regardless of the races. These few differences may be linked to the management of bulls in the place where the strows were produced. The shading of paddocks and frequent bathing of animals during hot days may have softened the interference of heat stress in these animals, uniforming the quality of doses during the year.

**Keywords:** Semen. Cromatine. Toluidine Blue.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1:</b> Modelo de substituição de histonas por protaminas na cromatina espermática.....	18
<b>Figura 2:</b> Tipos de alterações de cromatina.....	26

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1a:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.....29
- Tabela 1b:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.....29
- Tabela 1c:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente da raça.....30
- Tabela 1d:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína e taurina, independente da estação do ano.....30
- Tabela 2a:** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.....31
- Tabela 2b:** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.....32
- Tabela 2c:** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente de raça.....32
- Tabela 2d:** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros da raça taurina e zebuína, independente da estação do ano.....32
- Tabela 3a:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.....33
- Tabela 3b:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.....33
- Tabela 3c:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente da raça.....34
- Tabela 3d:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros da raça taurina e zebuína, independente da estação do ano.....34
- Tabela 4a:** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.....35
- Tabela 4b:** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.....35
- Tabela 4c:** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente da raça.....35
- Tabela 4d:** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros da raça taurina e zebuína, independente da estação do ano.....36

## LISTA DE ABREVIATURA

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
AT	Azul de Toluidina
TVC	Cone Testicular Vascular
N	Normal - sem áreas de descompactação
DB	Descompactação na Base
DMB	Descompactação na Metade Basal
DEC	Descompactação no Eixo Central
DT	Descompactação Total
DD	Descompactação Dispersa
DA	Descompactação na região apical
A	Área
P	Perímetro
L	Largura
C	Comprimento
L/C	Razão Largura Comprimento
E	Elipsidade
FF	Fator Forma
F0	Fourier 0
F1	Fourier 1
F2	Fourier 2
SLL	Simetria Latero Lateral
SAP	Simetria Anterior Posterior
D	Descompactação média da cromatina
H	Heterogeneidade média da cromatina.
MN	Morfologia Normal
DMA	Defeitos maiores
DME	Defeitos menores
VOL	Volume do ejaculado fresco
COM	Concentração do ejaculado fresco em milhões de células por ml
MPG	Motilidade progressiva do ejaculado após congelamento

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Espermatogênese.....	15
2.2 Espermatozoide.....	16
2.3 Cromatina espermática.....	17
2.4 Interferência do calor na qualidade espermática.....	19
2.5 Técnicas para Estudo de Cromatina.....	19
2.5.1 Azul de Toluidina (AT).....	20
2.5.2 - Identificação e classificação das alterações de cromatina espermática utilizando análise de imagem computadorizada.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Obtenção e organização das amostras.....	23
4.2 Espermograma.....	23
4.3. Confeções das lâminas.....	24
4.4. Análise computacional das imagens.....	24
4.4.1. Segmentação das cabeças dos espermatozoides.....	24
4.4.2. Classificação quanto aos tipos de alteração da cromatina.....	25
4.4.3 Descompactação e heterogeneidade da cromatina.....	26
4.4.4 Variáveis Morfométricas da Cabeça Espermática.....	27
4.5 Análise Estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o gameta masculino é organizado morfológicamente em cabeça e cauda, sendo a região da cabeça formada por acrossoma, núcleo e pequena quantidade de citoplasma (BELETTI, 2013). A cabeça é arredondada e achatada, onde se encontra o núcleo celular, o acrossoma e o citoesqueleto em mínimas quantidades (TOSHIMORI, EDDY, 2014; FLESCHE, GADELLA, 2000). Composto o núcleo celular podemos evidenciar um complexo de DNA, RNA e proteínas, que chamamos de cromatina. Durante a espermatogênese em mamíferos, ocorre a reorganização dessa cromatina, caracterizada pela substituição de histonas, proteínas características de cromatina de célula somática, por protaminas, que são proteínas que se associam ao DNA e dão origem a estruturas mais condensadas, denominadas de toroides, conferindo maior compactação ao DNA e conseqüentemente reduzindo o tamanho da cabeça espermática (BALHORN et al., 2000).

O toroide de protamina é a unidade básica da cromatina de espermatozoides (HUD et al.; 1993). São formados por aproximadamente 50.000 pb de DNA fortemente organizados pelas protaminas, criando uma estrutura arredondada em forma de “donuts”, a qual tem grande importância para a proteção e manutenção da estabilidade do material genético (BALHORN, 1982).

Estudos já realizados demonstram que o estresse térmico tem participado de forma negativa no desempenho reprodutivo de touros (BRITO et al, 2014; KASTELIC et al 2001). Porém a maioria deles se limitam em analisar apenas motilidade progressiva, vigor e morfologia celular, enquanto a integridade da cromatina espermática também pode ser afetada pelo estresse térmico e interferir no processo de fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial (LUCIO et al 2016; HIRAIWA, 2015; WARD, 2010).

Um método que pode ser utilizado para identificar e classificar alterações de cromatina é o uso da técnica de coloração com azul de toluidina (AT) (BELETTI et al., 2005). O AT é um corante catiônico que possui a propriedade de metacromasia, alteração de coloração induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante (MELLO, 1982). A metacromasia induzida por hidrólise ácida aumenta a sensibilidade da reação da coloração, retirando parte das protaminas e expondo os fosfatos de DNA, onde as moléculas do corante se ligam. Assim aqueles espermatozoides com compactação de cromatina normal sofrem menos efeitos da hidrólise e apresentam coloração azulada mais clara, enquanto os que apresentam alterações de compactação sofrem mais com a hidrólise ácida, permitindo mais ligações do AT aos fosfatos



do DNA, apresentando coloração azul escuro ou magenta, possibilitando comparar alterações de compactação de cromatina em espermatozoides.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Espermatogênese**

A espermatogênese, evento complexo e delicado, é caracterizada pela formação de espermatozoides a partir do crescimento e diferenciação das células germinativas primordiais (PGCs). Esse processo é contínuo e tem início na puberdade, pela influência de fatores de crescimento como a proteína morfogenética óssea 8B (BMP8B) (ZHAO et al 1996). A espermatogênese bovina é programada em três estágios distintos, iniciada pela espermatocitogênese, seguida da meiose e espermiogênese, que duram aproximadamente 21,23 e 17 dias respectivamente, totalizando 61 dias no total (JOHNSON et al 2000).

A espermatocitogênese é determinada pelas divisões mitóticas das PGCs afim de formar espermatogônias do tipo A1, que são consideradas células-tronco. Nesse momento, algumas espermatogônias A1 podem se dividir produzindo mais células-tronco, renovando o estoque no epitélio germinativo (HOCHEREAU-DE REVIERS, 1976). E outras A1 podem passar por mitoses, afim de formar espermatogônias do tipo A2, A3 e A4, progressivamente (JOHNSON, 1995). Por sua vez, espermatogônias do tipo A4 dividem-se formando espermatogônias intermediárias que passam por mitose e dão origem a espermatogônia tipo B, que então origina os espermatócitos. E todas essas mitoses ocorrem no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos (RAHMAN et al 2018).

A fase meiótica é iniciada pela meiose I, com os espermatócitos primários duplicando o seu DNA e passando por mudanças nucleares da prófase I, até se dividirem completamente dando origem ao espermatócitos secundários (AMANN, 1982). Os espermatócitos secundários dão continuidade ao processo passando por meiose II, formando células haploides denominadas espermátides redondas (WROBEL et al, 1985).

O conjunto de eventos futuros, como a diferenciação da espermátide em espermatozoide propriamente dito é denominado espermiogênese, fase final da espermatogênese. Durante a espermiogênese ocorrem mudanças extremamente importantes para a viabilidade do espermatozoide. São elas: formação do flagelo, o desenvolvimento do acrossoma na cabeça do espermatozoide (CLEMERMONT, TANG, 1985; TANIET et al., 1992; YOSHINAGA e. al., 2001) e a condensação da cromatina espermática, caracterizada pela substituição da maioria das histonas por protaminas (BALHORN et al., 2000). A presença da

protamina possibilita uma notável redução nuclear para o espermatozoide, além de proteger seu material genético ao longo de sua jornada até o ovócito (WARD; 2010, JOHSON et al., 2011).

As espermátides ao longo da sua diferenciação se movem dentro do epitélio germinativo, parede dos túbulos seminíferos, em direção ao lúmen. Por fim elas são liberadas no lúmen, passando por um evento final chamado de espermição, dando origem aos espermatozoides que são direcionados para o epidídimo, onde ocorre a maturação final e armazenamento da célula (YOSHINAGA, TOSHIMORI, 2003).

## **2.2. Espermatozoide**

Com morfologia e funcionalidade bastante específica, o espermatozoide é a célula originada da gametogênese masculina, que possui a finalidade de fecundar o gameta feminino e perpetuar seu material genético, iniciando a formação de um novo indivíduo. A célula é descrita contendo dois componentes principais, cabeça e cauda, que são conectadas por uma peça conectora ou também conhecida como pescoço ou colo. A cabeça abriga o núcleo celular, acrossoma, estruturas de citoesqueleto e citoplasma em mínima quantidade. A cauda, partindo do pescoço até o seu fim, é dividida em peça intermediária, peça principal e peça terminal. Na peça intermediária e peça principal, há uma estrutura de microtúbulos organizados chamados de axonema, que ainda é envolto por fibras densas, de constituição proteica. Na peça intermediária, o axonema é envolto também por mitocôndrias que fornecerão energia para célula (TOSHIMORI, EDDY, 2014).

A célula espermática de mamíferos comparada com uma célula somática é 10 vezes menor (MILLER et al., 2010). Sua cromatina é cerca de 20 vezes mais compactada em relação as outras células, devido a presença da protamina (BALHORN, 2007), o que proporciona ao seu material genético alta condensação e compactação, tornando a morfologia dessa célula ainda mais especial (SHARMA, AGARWAL, 2011).

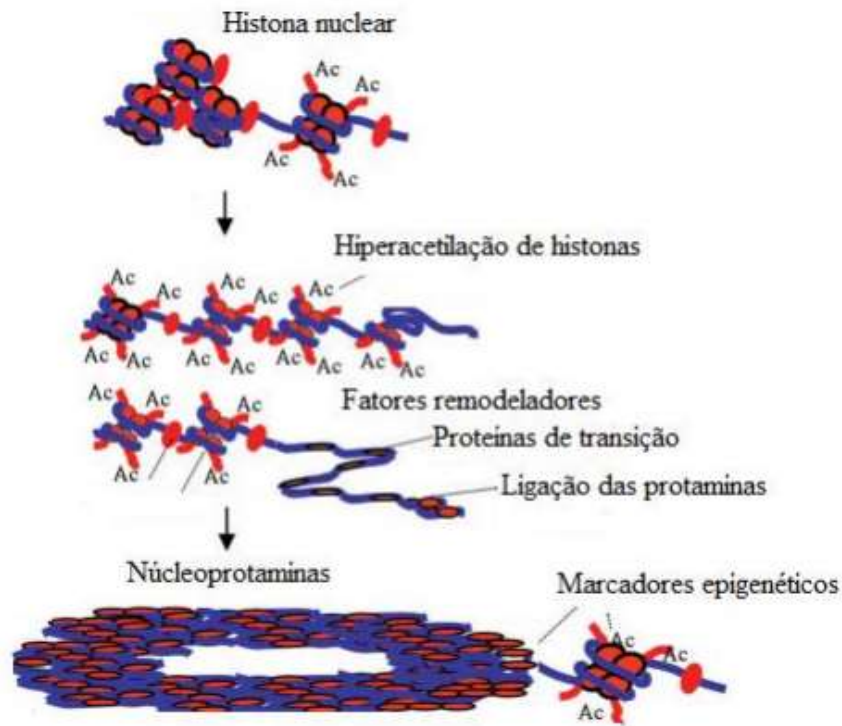
Para que o espermatozoide seja capaz de fecundar o gameta feminino, ele deve ser morfológicamente e funcionalmente normal, características obtidas de uma espermatogênese bem-sucedida (NISHIMUNE, OKABE, 1993) e ter sido maturado e capacitado adequadamente pela passagem no epidídimo (BANKS, 1992). Além disso, a capacidade de fecundação do espermatozoide está ligada a aspectos funcionais da célula, como motilidade progressiva, capacitação, reação do acrossoma e a ligação e penetração no ovócito, para que se inicie o desenvolvimento embrionário (JONES, 1998). O sucesso na fertilização e no desenvolvimento

do embrião também dependem da integridade da cromatina, bem como sua compactação correta (BARRATT et al., 2010).

### 2.3. Cromatina espermática

Para que o espermatozoide cumpra seu objetivo de alcançar e fecundar o ovócito e contribua com o seu material genético no desenvolvimento embrionário, é necessário que a célula tenha propriedade hidrodinâmica e seu DNA seja devidamente compactado para garantir sua estabilidade e proteção. Isso só é possível pela presença de proteínas nucleares chamadas protaminas, presentes apenas na cromatina do espermatozoide maduro (BALHORN, 2007). A cromatina do espermatozoide é composta por DNA, RNA e proteínas. Em células somáticas as principais proteínas encontradas são as histonas, organizadas em octâmeros que formam o nucleossomo, unidade básica da cromatina somática. O nucleossomo é formado por pares de histonas H2A, H2B, H3 e H4 nas quais a dupla hélice de DNA dá duas voltas, abrangendo cerca de 147 pares de bases em cada estrutura (RAVAZI, 2017). Já nos espermatozoides a unidade básica da cromatina é o chamado toroide de protamina.

Durante a espermatogênese a cromatina passa por uma remodelação, onde a maioria das histonas são substituídas por protaminas, que se organizam formando os toroides (DE VRIES et al., 2012; HUD et al.; 1993). Durante esse fenômeno, os nucleossomos são desmontados devido a uma hiperacetilação, fazendo com que as histonas sejam removidas da fita de DNA e substituídas por proteínas de transição, como mostra a **figura 1**. Em seguida, as protaminas ocupam o lugar das proteínas de transição, fazendo ligações entre elas por pontes de dissulfeto e pontes de zinco, deixando a estrutura ainda mais estável e compactada (OLIVA, CASTILLO, 2011).



**Figura 1:** Modelo de substituição de histonas por protaminas na cromatina espermática. Em azul está representando o DNA e em vermelho histonas, proteínas de transição e protaminas (MENDONÇA, 2015; adaptado de OLIVA et al., 2009)

Essa nova estrutura é composta por aproximadamente 50.000 pares de bases de DNA associado a protamina, organizado em forma de “donut” (rosca arredondada e furada no meio) ou toroide, o que gera maior compactação do DNA (BALHORN, 1982). Esse tipo de compactação é capaz de silenciar a expressão gênica e proteger o DNA espermático, mantendo sua integridade ao longo de sua jornada pelo sistema reprodutor masculino e feminino, além de reduzir o tamanho da cabeça do espermatozoide, melhorando suas propriedades hidrodinâmicas, permitindo que o gameta masculino chegue até o ovócito em boas condições (BRAUN, 2001).

## 2.4. Interferência do calor na qualidade espermática

Os efeitos dos fatores climáticos sobre a qualidade do sêmen bovino têm sido amplamente estudados (STÄLHAMMAR et al., 1989; WILDEUS, HAMMOND, 1993; BRITO et al., 2002; MALAMA et al., 2017). Sabe-se que a redução na motilidade, número de células no ejaculado e aumento nos defeitos morfológicos estão relacionados com o aumento da temperatura testicular (KASTELIC et al., 1996; KOIVISTO et al. 2009). Essa relação entre a variação climática e a qualidade do sêmen tem sido atribuída especialmente às interferências no mecanismo de termorregulação escrotal, que fica comprometida pelo aumento de calor (MENEGASSI et al., 2015).

Para que o sistema reprodutor masculino funcione de maneira adequada, a temperatura dos testículos precisa ser controlada por mecanismos fisiológicos complexos, que envolvem o escroto, o cone testicular vascular (TVC) e os próprios testículos (WAITES, MOULE, 1962; KASTELIC, COOK, COULTER, 1997). Por isso, quando há variação morfológica de estruturas entre touros, pode ocorrer interferência na termorregulação testicular e por consequência influenciar na qualidade espermática entre animais. Touros *Bos taurus indicus*, por exemplo, quando expostos a altas temperaturas ambientais são mais resistentes, têm menos impactos na qualidade do sêmen e se recuperam mais rápido do que touros *Bos taurus taurus* (JOHNSTON, NAELAPAA, FRYE, 1963; SKINNER, LOUW, 1996). Assim, essas diferenças indicam que a adaptabilidade de um touro às condições ambientais locais podem ter influência na qualidade do sêmen (NICHI et al., 2006), o que indica que pode haver diferenças na capacidade reprodutiva dos animais de acordo com a estação do ano e com o local em que ele vive.

## 2.5 Técnicas para Estudo de Cromatina

Nos últimos anos, muitas técnicas foram desenvolvidas para se estudar componentes do espermatozoide, bem como sua viabilidade relacionada com a fertilidade. Nesse sentido, as alterações da cromatina espermática têm sido um tema importante a ser estudado, já que podem interferir no processo de fecundação e desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013). Essas alterações podem ser avaliadas por diferentes métodos, como: Azul de toluidina (AT) (BELETTI et al., 2005), azul de anilina (HAMMADEH et al., 2001), ensaio cometa (RIBAS-MAYNOU et al., 2013), laranja de acridina (TEJADA et al., 1984), ensaio TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) (SHARMA et al., 2013),

ensaio de estrutura de cromatina espermática (SCSA) (EVENSON et al., 2002) teste de cromomicina A3 (CMA3) (OZKOSEM et al., 2016), teste de dispersão de cromatina espermática (SCD) (FERNÁNDEZ et al., 2003), e fluorescência de detecção de quebra de DNA em teste de hibridação *in situ* (DBD-FISH) (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2015), sendo o AT um dos métodos mais viáveis, por ser simples e de baixo custo.

### **2.5.1 Azul de Toluidina (AT)**

A análise com AT é usada para identificar alterações de compactação de cromatina e, por delinear a cabeça do espermatozoide, permite também o estudo da morfometria dessa célula (BELETTI, COSTA, 2003; BELETTI, MELLO, 2004, BELETTI et al., 2005). A molécula de AT tem capacidade de se ligar aos fosfatos da fita de DNA, corando o local em tons de azul, mas para que isso ocorra o fosfato precisa estar exposto às moléculas do AT. Em uma cromatina espermática normal a maioria dos fosfatos estão bloqueados por protaminas, o que dificulta a ligação do AT ao DNA, enquanto em uma cromatina com alterações de compactação o DNA encontra-se mais exposto permitindo mais ligações do corante no local. Dessa forma, devido ao fenômeno de metacromasia, ocorrem alterações de cores pela ressonância de elétrons das moléculas desse corante nos locais da cromatina. As regiões mais compactadas apresentam cores que variam entre verde e azul claro, e onde há menos compactação as cores podem variar entre azul escuro e magenta (BELETTI, 2013; MELLO, 1982).

Para melhorar a sensibilidade do AT ao DNA, Mello (1982) propôs a metacromasia induzida, que amplifica o resultado da reação do corante usando hidrólise ácida no espermatozoide antes da coloração com AT. A cromatina espermática é hidrolisada afim de eliminar parcialmente as proteínas nucleares para que os fosfatos do DNA fiquem mais expostos. Dessa forma, as cromatinas normais, altamente compactadas, são pouco afetadas pela hidrólise e continuam expondo menos fosfatos e por consequência apresentam cor azul claro. Por outro lado, as cromatinas alteradas, menos compactadas, são mais suscetíveis à hidrólise, perdem mais proteínas e permitem maior acesso do AT aos fosfatos do DNA, apresentando cor azul escuro ou magenta.

## **2.5.2 - Identificação e classificação das alterações de cromatina espermática utilizando análise de imagem computadorizada**

A análise de imagem computadorizada é uma importante ferramenta para estudos em alterações de cromatina espermática, uma vez que elimina a subjetividade da análise, além de melhorar também a capacidade de reprodução de imagens e detectar sutis alterações que poderiam ser ignoradas usando métodos convencionais (HAMILTON; ALLEN, 1995; SOUZA et al., 2018).

Estudos em biologia da reprodução têm desenvolvido sistemas em análise de imagem computadorizada com o objetivo de avaliar função espermática (ARRUDA, 2000; BELETTI et al., 2005; MATOS et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010; SOUZA et al., 2018). Esses estudos apontam para o desenvolvimento de métodos capazes de avaliar o potencial de fertilidade do sêmen, oferecendo mais informações e mais objetividade para as análises (ARRUDA et al., 2011). No entanto, a maioria desses sistemas estão focados apenas a análises de motilidade e morfologia espermática, como o software automatizado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), enquanto alterações de cromatina também podem interferir significativamente na fertilidade espermática e desenvolvimento embrionário inicial (LUCIO et al 2016; HIRAIWA, 2015; WARD, 2010).

A técnica de coloração com AT associada a análise de imagem computadorizada é uma excelente forma de identificar problemas de compactação de cromatina em espermatozoides, capaz de identificar alterações baseadas na localização das áreas de descompactação na cabeça espermática. Utilizando imagens de cabeças de espermatozoides coradas com AT após hidrólise ácida e um software que identifica regiões descompactadas de cromatina pelo contraste do corante, Souza et al. (2018) classificaram essas alterações em: normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação no eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa; DA, descompactação na região apical, de acordo com as marcações do software.

A coloração com AT e análise de imagem computadorizada também permite avaliar a morfometria da cabeça do espermatozoide, já que a região da cabeça é basicamente formada por cromatina, a qual pode ser evidenciada pelo corante (BELETTI et al 2005; BELETTI, 2013). Com a ajuda de um programa, podem-se avaliar diversas variáveis morfológicas da cabeça do espermatozoide, como a área, perímetro, largura, comprimento, elipsidade, razão largura/ comprimento, fator de forma, simetria látero lateral, simetria ântero posterior e as primeiras

harmônicas da transformada integral de Fourier (Fourier 0, Fourier 1 e Fourier 2) (BELETTI, COSTA, 2003).

Essas duas opções geram resultados que podem ser correlacionados, visto que defeitos na cromatina podem resultar em anomalias morfológicas (BELETTI et al., 2005; BELETTI, 2013), além de possibilitar avaliações mais precisas do sêmen, uma vez que tem se visto touros que apresentam espermatozoides com morfologia, motilidade e enzimas normais apresentando-se como subfêrteis. Essa situação verificada, na maioria das vezes, ocorre devido a defeitos na compactação da cromatina nos espermatozoides (BELETTI, MELLO, 1996).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Objetiva-se com o presente trabalho comparar a qualidade de doses de sêmen de touros zebuínos e taurinos produzidas no inverno e no verão na microrregião de Uberaba, MG, Brasil, por análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com AT.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1 – Comparar a análise de qualidade do sêmen feita por espermograma (motilidade, concentração e morfologia), a compactação da cromatina e a morfometria espermática de sêmen de touros durante período quente e frio do ano.

2 – Comparar a análise de qualidade do sêmen feita por espermograma (motilidade, concentração e morfologia), a compactação de cromatina e a morfometria dos espermatozoides de touros europeus e zebuínos.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção e organização das amostras**

Foram analisadas doses de sêmen de quatro touros de raça zebuína (Nelore) e quatro touros de raças taurinas (Red Angus, Angus, Brangus e Braford), produzidas nos meses quentes do final do ano (dezembro a fevereiro) e nos meses com temperaturas mais amenas, no meio do ano (maio a julho). Os ejaculados foram coletados com o uso de vagina artificial e posteriormente processados em uma central de inseminação artificial de Uberaba-MG. Para estudar a interferência do estresse calórico na qualidade das doses, foram analisadas as seguintes variáveis: concentração, motilidade, morfologia dos espermatozoides, morfometria da cabeça dos espermatozoides, descompactação e heterogeneidade médias da cromatina espermática e a localização da descompactação da cromatina espermática. A partir dessas análises, comparou-se os resultados entre doses produzidas no inverno e no verão em touros zebuínos e taurinos separadamente. Além disso, também comparou-se todas as doses produzidas no inverno com as doses do verão, independente das raças dos touros e todas as doses das raças taurinas com as zebuínas, sem levar em consideração a época em que foram produzidas.

### **4.2 Espermograma**

O sêmen passou por análises de concentração, motilidade progressiva, volume e morfologia celular, que são os testes mais comuns realizados como parâmetros de controle de qualidade do sêmen em centrais de Inseminação Artificial.

O volume do ejaculado fresco foi obtido pela pesagem do mesmo em uma balança de precisão, admitindo 1ml para cada 1g de ejaculado. A concentração foi avaliada por espectrofotômetro, onde alíquota do ejaculado foi previamente diluída em solução salina para a análise. A motilidade progressiva foi avaliada após o descongelamento das doses, pelo software CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), e a morfologia foi observada por microscopia de luz, objetiva 100x imersão, classificando as células em MN quando apresentou morfologia normal, DMA quando apresentou defeitos morfológicos maiores e DME quando apresentou defeitos morfológicos menores, realizadas conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

### **4.3. Confeções das lâminas**

Após a obtenção das doses de sêmen, 10 esfregaços de cada touro foram feitos, cinco de uma dose produzida no verão e cinco de outra dose produzida no inverno. Os esfregaços foram fixados em etanol-ácido acético (3:1; v/v) por um minuto e posteriormente em etanol 70% por três minutos. Após a fixação, as amostras foram secas em temperatura ambiente. Posteriormente, os esfregaços foram hidrolisados em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e lavados em água destilada. Após a secagem, foi colocada uma gota de Azul de Toluidina 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine, pH 4,0) sobre os esfregaços, os quais foram cobertos com laminula e após três minutos, foram fotografados em microscópio de luz convencional.

### **4.4. Análise computacional das imagens**

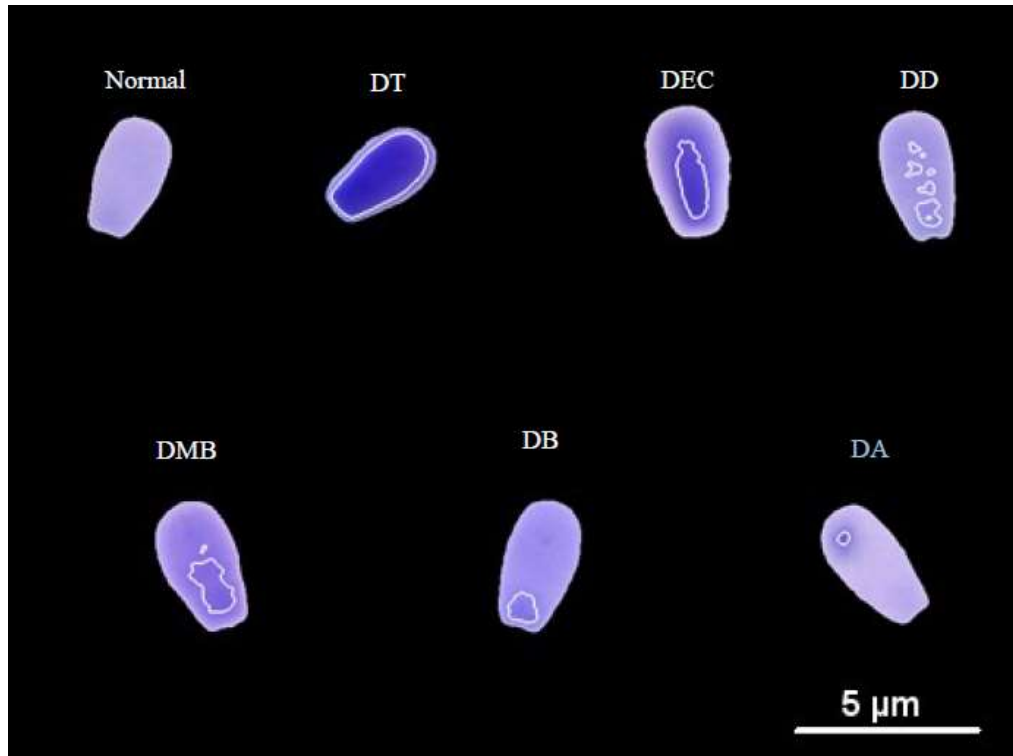
As análises de imagens computacionais foram divididas em três etapas: segmentação das cabeças, classificação dos tipos de alteração da cromatina e análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade de cromatina e da morfometria da cabeça dos espermatozoides. As imagens digitais de pelo menos 100 espermatozoides foram capturadas dos esfregaços, utilizando-se um microscópio (Axiolab - ZEISS) acoplado a um sistema de captura de imagens (AxioCam ICc 5), com objetiva de imersão de 100 X.

#### **4.4.1. Segmentação das cabeças dos espermatozoides**

As imagens foram segmentadas por limiarização (thresholding), para obter uma imagem denominada de máscara, que possui apenas dois tons de cores, preto e branco, que quando combinada com a imagem original, cria uma imagem somente com as cabeças dos espermatozoides, eliminando elementos da imagem original, como cauda e demais estruturas coradas no esfregaço. Assim, foi possível isolar cada cabeça de espermatozoide em uma imagem. Essas imagens passaram por processamento utilizando uma técnica matemática, chamadas de Operação de Erosão, para descartar os pixels no perímetro da cabeça do espermatozoide e suavizar o contorno das imagens. Esse processamento foi realizado por programa desenvolvido em linguagem MATLAB e executado no software OCTAVE (CRUZ et al., 2014).

#### **4.4.2. Classificação quanto aos tipos de alteração da cromatina**

Assim como no processo de segmentação da cabeça, para essa avaliação foi utilizado um programa desenvolvido em MATLAB e executado em OCTAVE. Inicialmente, o programa identificou as 6 cabeças mais compactadas (coloração mais clara) para cada amostra. A média dos valores de pixels dessas 6 cabeças foram consideradas como valor padrão. Posteriormente, foi calculado um limiar de cada cabeça usando esses valores como referência e os pixels que possuíam valor menor que essa média foi delineado pelo software. A imagem produzida foi suavizada, usando um filtro Gaussiano ( $\sigma=2$ , raio=2,5) para reduzir o ruído e melhor delimitar a região alterada. Por fim, o delineamento foi realizado pela demarcação de linhas brancas que definiu a região de descompactação. Dessa forma, tipos de alteração de cromatina de acordo com a localização da descompactação foram determinados (SOUZA et al, 2018). Para organizar a análise do estudo, as alterações cromatínicas foram divididas em: 1) Descompactação na base (DB), atinge no máximo o terço basal da cabeça; 2) Descompactação na metade basal (DMB), além do terço basal, atinge também até dois terços da cabeça; 3) Descompactação no eixo central (DEC), ocorre em todo o eixo central sem atingir as laterais da cabeça; 4) Descompactação total (DT), a cabeça como um todo está descompactada; 5) Descompactação dispersa (DD), áreas de descompactação dispersas na cabeça do espermatozoide; 6) Descompactação na região apical (DA), atinge a região apical da cabeça do espermatozoide; Normal (N), ausência de áreas de descompactação (Figura 2). Todas as classificações foram realizadas por um mesmo avaliador.



**Figura 2:** Tipos de alterações de cromatina. Normal: sem áreas de descompactação; DB: descompactação na base; DMB: descompactação na metade basal; DEC: descompactação no eixo central; DT: descompactação total; DD: descompactação dispersa; DA: descompactação na região apical (Fonte: MARTINS, 2018).

#### 4.4.3 Descompactação e heterogeneidade da cromatina

Todo o processamento e análise de imagem para avaliação da descompactação e heterogeneidade médias da cromatina dos espermatozoides de cada amostra foram realizados por rotinas desenvolvidas e executadas em ambiente de programação SCILAB. Para isso as imagens das cabeças espermáticas foram transformadas em tons de cinza. Os valores médios dos pixels de cada cabeça foram determinados e aquelas 10 cabeças com maiores médias (cabeças mais claras) foram automaticamente selecionadas e consideradas como cabeças padrão. Posteriormente, a diferença entre o valor médio das cabeças-padrão e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada em porcentagem do valor médio das cabeças-padrão, caracterizando quantitativamente a intensidade da descompactação da cromatina de cada cabeça avaliada. O coeficiente de variação dos níveis de cinza de cada cabeça foi também calculado, caracterizando quantitativamente a heterogeneidade da cromatina, ou seja, a variação da compactação cromatínica em toda extensão da cabeça do espermatozoide (BELETTI et al., 2005).

#### 4.4.4 Variáveis Morfométricas da Cabeça Espermática

As variáveis utilizadas para classificar a morfometria das cabeças dos espermatozoides foram determinadas por um algoritmo também desenvolvido no ambiente de programação SCILAB. As características estudadas foram: Área (A), Perímetro (P), Lado (L) e Comprimento (C) que são as principais variáveis consideradas em análises de células espermáticas, para identificar alterações morfológicas e Razão Largura Comprimento (L/C) que é derivada das mensurações anteriores (L e C) (BELETTI, COSTA, VIANA, 2005; YÁNIZ et al., 2013; BARTH, OKO 1989). Elipsidade (E) que é a mensuração do contorno e alongamento da cabeça espermática  $E = (C - L) / (C + L)$  (BELETTI, COSTA, VIANA, 2004; MARTÍ, APARICIO, GARCÍA-HERREROS, 2011; BARTH, OKO 1989). Fator Forma (FF) Indica o desvio do contorno da cabeça em relação a uma elipse suave  $FF = (1 - E) \times P^2/4\pi A$  (BELETTI, COSTA, VIANA, 2004; MARTÍ; BARTH, OKO 1989). Harmônicas de Fourier que correspondem à magnitude da transformada de Fourier obtida a partir do contorno das cabeças dos espermatozoides em análises, F0 está relacionada com o tamanho total da cabeça dos espermatozoides, F1 associada com o arredondamento da porção anterior da cabeça espermática e F2 que representa o alongamento da cabeça da célula (BARTH, OKO 1989; CAMPOS et al., 2013). Simetria Latero-Lateral (SLL) que identifica assimetrias ao longo do eixo principal da cabeça espermática, que pode interferir na propriedade hidrodinâmica da célula e Simetria Antero-Posterior (SAP) que indica assimetrias ao longo do eixo secundário da cabeça (BELETTI, COSTA, VIANA, 2005; YÁNIZ et al., 2013)

#### 4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Excel (Microsoft, USA). O teste T pareado foi utilizado para comparar as amostras quando agrupadas em doses de touros zebuínos (comparando inverno e verão), doses de touros taurinos (comparando inverno e verão) e para comparar as doses produzidas no inverno e no verão, independente da raça dos touros. E o teste T em amostras independentes foi utilizado para comparar todas as doses de touros zebuínos e taurinos, independente da época do ano em que foram produzidas. Foram consideradas diferenças significativas quando  $P \leq 0,05$  e tendência a diferença quando  $0,05 < P > 0,1$ .

## 5. RESULTADOS

Ao analisar a morfometria da cabeça do espermatozoide, o grupo isolado de taurinos apresentaram diferença entre verão e inverno apenas na área das cabeças dos espermatozoides, como mostra a tabela 1a. O estudo indicou que a área das cabeças dos espermatozoides produzidos no verão é maior que no inverno, com diferença significativa de  $p= 0,04$ . Além disso, o mesmo grupo apresentou tendência em ter células com perímetro da cabeça maior também no verão, com  $p= 0,08$ .

Quando comparadas as doses isoladas dos touros zebuínos, a produção do inverno e verão não apresentaram diferenças significativas, e sim apenas uma tendência de as cabeças serem mais largas nas doses de inverno do que no verão ( $p= 0,06$ ) (tabela 1b). Da mesma forma, as doses produzidas no verão e inverno quando analisadas em conjunto sem considerar as raças dos touros, também não apresentaram diferenças significativas (tabela 1c).

Como mostra a tabela 1d, comparando todas as doses dos touros zebuínos com as doses dos touros taurinos, sem considerar a estação do ano em que foram produzidas, percebe-se muitas diferenças morfométricas entre as raças. A cabeça dos espermatozoides dos touros taurinos (*Bos taurus taurus*) apresentaram maiores área ( $p=0,02$ ), harmônica 2 da transformada Fourier ( $p=0,04$ ), simetria latero lateral ( $p=0,03$ ), descompactação média da cromatina ( $p=0,03$ ) e heterogeneidade média da cromatina ( $p=0,0006$ ) em relação as cabeças dos touros zebuínos (*Bos taurus indicus*). Além dessas diferenças, essa comparação também revelou uma tendência de cabeças com maior perímetro e largura no grupo dos taurinos, com  $p= 0,06$  e  $p=0,08$  respectivamente.

**Tabela 1a:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros de raça taurina (*Bos taurus taurus*) produzidos no verão e no inverno.

	<b>A</b> ( $\mu\text{m}^2$ )	<b>P</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>L</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>C</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>L/C</b>	<b>E</b>	<b>FF</b>	<b>F0</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>SLL</b>	<b>SAP</b>	<b>D</b>	<b>H</b>
<b>Verão</b>	30,78 ± 0,89	22,83 ± 0,25	4,42 ± 0,13	8,50 ± 0,12	0,52 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,92 ± 0,01	5128,81 ± 208,52	607,52 ± 123,84	420,90 ± 28,63	0,973 ± 0,002	0,93 ± 0,02	7,67 ± 1,15	4,87 ± 0,38
<b>Inverno</b>	30,41 ± 0,77	22,69 ± 0,27	4,39 ± 0,11	8,44 ± 0,10	0,52 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,92 ± 0,01	5063,70 ± 48,96	577,51 ± 171,33	402,48 ± 20,00	0,974 ± 0,003	0,93 ± 0,02	6,90 ± 0,93	5,19 ± 1,01
<b>Valor P</b>	0,04	0,08	0,49	0,31	0,95	0,94	0,94	0,56	0,46	0,38	0,65	0,28	0,42	0,39

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T pareado. A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; D, descompactação média da cromatina; H, heterogeneidade média da cromatina.

**Tabela 1b:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína (*Bos taurus indicus*) produzidos no verão e no inverno.

	<b>A</b> ( $\mu\text{m}^2$ )	<b>P</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>L</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>C</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>L/C</b>	<b>E</b>	<b>FF</b>	<b>F0</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>SLL</b>	<b>SAP</b>	<b>D</b>	<b>H</b>
<b>Verão</b>	28,85 ± 1,40	22,14 ± 0,66	4,29 ± 0,08	8,21 ± 0,35	0,52 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,93 ± 0,01	4794,86 ± 510,56	600,33 ± 112,11	382,37 ± 32,42	0,970 ± 0,002	0,93 ± 0,01	5,83 ± 2,46	3,74 ± 0,21
<b>Inverno</b>	29,56 ± 1,38	22,40 ± 0,66	4,34 ± 0,10	8,31 ± 0,33	0,52 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,93 ± 0,01	4932,52 ± 479,21	599,56 ± 127,66	382,35 ± 26,35	0,971 ± 0,002	0,93 ± 0,01	5,33 ± 0,54	3,87 ± 0,43
<b>Valor P</b>	0,28	0,34	0,06	0,46	0,88	0,90	0,79	0,48	0,97	0,99	0,47	0,49	0,71	0,41

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T pareado. A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; D, descompactação; H, heterogeneidade.

**Tabela 1c:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente da raça.

	A( $\mu\text{m}^2$ )	P ( $\mu\text{m}$ )	L ( $\mu\text{m}$ )	C ( $\mu\text{m}$ )	L/C	E	FF	F0	F1	F2	SLL	SAP	D	H
<b>Verão</b>	29,81± 1,50	22,48 ± 0,59	4,36 ± 0,12	8,36 ± 0,29	0,52 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,93 ± 0,01	4961,83 ± 402,76	603,93 ± 109,38	401,64 ± 35,01	0,971 ± 0,003	0,93 ± 0,01	6,84 ± 2,03	4,30 ± 0,67
<b>Inverno</b>	29,99 ± ,13	22,54 ± 0,49	4,37 ± 0,10	8,38 ± 0,23	0,52 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,93 ± 0,01	4998,11 ± 348,30	588,54 ± 40,3738	392,41 ± 24,18	0,972 ± 0,003	0,93 ± 0,01	6,11 ± 1,10	4,53 ± 1,01
<b>Valor P</b>	0,61	0,67	0,68	0,77	0,94	0,97	0,76	0,72	0,46	0,45	0,38	0,15	0,38	0,22

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T pareado. A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; D, descompactação; H, heterogeneidade.

**Tabela 1d:** Médias e desvios-padrões das variáveis morfométricas das cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína e taurina, independente da estação do ano.

	A ( $\mu\text{m}^2$ )	P ( $\mu\text{m}$ )	L ( $\mu\text{m}$ )	C ( $\mu\text{m}$ )	L/C	E	FF	F0	F1	F2	SLL	SAP	D	H
<b><i>Bos taurus indicus</i></b>	29,21 ± 1,34	22,27 ± 0,63	4,31 ± 0,09	8,26 ± 0,32	0,52 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,93 ± 0,01	4863,69 ± 464,27	599,95 ± 111,18	382,36 ± 27,35	0,970 ± 0,002	0,93 ± 0,01	5,58 ± 2,03	3,80 ± 0,32
<b><i>Bos taurus taurus</i></b>	30,59 ± 0,79	22,76 ± 0,25	4,41 ± 0,11	8,47 ± 0,11	0,52 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,92 ± 0,01	5096,26 ± 144,47	592,51 ± 139,32	411,69 ± 24,89	0,973 ± 0,003	0,93 ± 0,02	7,29 ± 1,10	5,03 ± 0,73
<b>Valor P</b>	0,02	0,06	0,08	0,11	0,80	0,81	0,35	0,20	0,91	0,04	0,03	0,67	0,03	0,0006

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T (amostras independentes). A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipsidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior; D, descompactação; H, heterogeneidade.



Em relação aos locais de descompactação da cromatina nas cabeças dos espermatozoides, os touros de raça taurina, quando estudados separadamente, apresentaram maior número de células normais (sem alterações de descompactação na cromatina) no verão do que no inverno ( $p=0,003$ ) e uma tendência de  $p=0,08$  das células possuírem mais descompactações de cromatina na metade basal da célula no inverno do que no verão (Tabela 2a).

O grupo com doses apenas de touros zebuínos não apresentaram nenhuma diferença significativa nos locais de descompactação de cromatina entre as doses produzidas no inverno e no verão (Tabela 2b), assim como também não ocorreram diferenças quando todas as doses produzidas no verão foram comparadas com as doses do inverno, independente das raças dos touros. Foi observada apenas uma tendência ( $p=0,09$ ) de mais descompactações na metade basal das células em doses produzidas no inverno (tabela 2c). Porém, quando comparadas todas as doses dos touros zebuínos com os taurinos, excluindo o fator estação do ano, as descompactações na metade basal tiveram diferenças significativas de  $p=0,02$ , indicando haver mais desse tipo de descompactação no grupo dos taurinos (tabela 2d).

**Tabela 2a:** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.

	<b>N (%)</b>	<b>DB (%)</b>	<b>DMB (%)</b>	<b>DEC (%)</b>	<b>DT (%)</b>	<b>DD (%)</b>
<b>Verão</b>	69,05 ± 10,61	4,48 ± 2,63	2,98 ± 3,03	0,13 ± 0,25	0,23 ± 0,45	10,70 ± 7,71
<b>Inverno</b>	60,03 ± 12,46	6,88 ± 6,37	14,53 ± 10,93	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,3	18,43 ± 6,38
<b>Valor P</b>	0,003	0,37	0,08	0,39	0,82	0,37

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T - pareado. N, normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa.

**Tabela 2b.** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.

	<b>N (%)</b>	<b>DB (%)</b>	<b>DMB (%)</b>	<b>DT (%)</b>	<b>DD (%)</b>
<b>Verão</b>	67,65 ± 19,36	2,13 ± 3,17	0,38 ± 0,75	0,00 ± 0,00	29,85 ± 18,15
<b>Inverno</b>	61,05 ± 25,57	4,68 ± 8,07	0,33 ± 0,38	0,30 ± 0,6	33,65 ± 24,98
<b>Valor P</b>	0,77	0,38	0,87	0,39	0,86

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T - pareado. N, normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa.

**Tabela 2c.** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente de raça.

	<b>N (%)</b>	<b>DB (%)</b>	<b>DMB (%)</b>	<b>DEC (%)</b>	<b>DT (%)</b>	<b>DD (%)</b>
<b>Verão</b>	68,35 ± 14,47	3,30 ± 2,97	1,68 ± 2,47	0,06 ± 0,18	0,11 ± 0,32	25,56 ± 13,70
<b>Inverno</b>	60,54 ± 18,63	5,78 ± 6,83	7,43 ± 10,43	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,45	26,04 ± 18,74
<b>Valor P</b>	0,44	0,15	0,09	0,35	0,61	0,96

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T - pareado. N, normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa.

**Tabela 2d.** Médias e desvios-padrões dos locais de descompactação de cromatina em cabeças de espermatozoides de touros da raça taurina e zebuína, independente da estação do ano.

	<b>N (%)</b>	<b>DB (%)</b>	<b>DMB (%)</b>	<b>DEC (%)</b>	<b>DT (%)</b>	<b>DD (%)</b>
<b><i>Bos taurus indicus</i></b>	64,35 ± 21,29	3,40 ± 5,84	0,35 ± 0,55	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,42	31,75 ± 20,32
<b><i>Bos taurus taurus</i></b>	64,54 ± 11,75	5,68 ± 4,69	8,75 ± 9,66	0,06 ± 0,18	0,19 ± 0,36	19,85 ± 6,73
<b>Valor P</b>	0,98	0,40	0,02	0,33	0,85	0,13

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T (amostras independentes). N, normal, sem áreas de descompactação; DB, descompactação na base; DMB, descompactação na metade basal; DEC, descompactação eixo central; DT, descompactação total; DD, descompactação dispersa.

Em relação a morfologia dos espermatozoides, não ocorreram diferenças significativas entre as doses dos touros taurinos e zebuínos, analisados separadamente em relação à época do ano, como mostram as tabelas 3a e 3b, respectivamente. Também não houve diferença entre as raças, quando comparado zebuínos e taurinos, independente da estação do ano (tabela 3d).

A tabela 3c mostra a comparação entre todas as doses produzidas no inverno com as do verão, independente da raça dos touros. As doses produzidas no inverno apresentam maior porcentagem de células com morfologia normal do que no verão ( $p=0,05$ ), enquanto os defeitos morfológicos menores estão mais presentes nas doses produzidas na época mais quente do ano.

**Tabela 3a:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.

	MN (%)	DMA (%)	DME (%)
<b>Verão</b>	77,75 ± 5,56	10,25 ± 4,11	12,00 ± 3,46
<b>Inverno</b>	81,75 ± 4,11	9,00 ± 3,74	9,25 ± 1,89
<b>Valor P</b>	0,11	0,14	0,42

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T pareado. MN, morfologia normal; DMA, defeitos maiores; DME, defeitos menores.

**Tabela 3b:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.

	MN (%)	DMA (%)	DME (%)
<b>Verão</b>	80,00 ± 4,69	10,00 ± 3,46	10,00 ± 1,83
<b>Inverno</b>	82,00 ± 3,16	8,75 ± 2,75	9,25 ± 0,50
<b>Valor P</b>	0,38	0,41	0,44

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T preado. MN, morfologia normal; DMA, defeitos maiores; DME, defeitos menores.

**Tabela 3c:** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente da raça.

	MN (%)	DMA (%)	DME (%)
<b>Verão</b>	78,88 ± 4,91	10,13 ± 3,52	11,00 ± 2,78
<b>Inverno</b>	81,88 ± 3,40	8,88 ± 3,04	9,25 ± 1,28
<b>Valor P</b>	0,05	0,10	0,05

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T preado. MN, morfologia normal; DMA, defeitos maiores; DME, defeitos menores.

**Tabela 3d.** Médias e desvios-padrões das variações de defeitos na morfologia em cabeças de espermatozoides de touros da raça taurina e zebuína, independente da estação do ano.

	MN (%)	DMA (%)	DME (%)
<b><i>Bos taurus indicus</i></b>	81,00 ± 3,85	9,38 ± 2,97	9,63 ± 1,30
<b><i>Bos taurus taurus</i></b>	79,75 ± 5,01	9,63 ± 3,70	10,63 ± 2,97
<b>Valor P</b>	0,58	0,88	0,39

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T (amostras independentes). MN, morfologia normal; DMA, defeitos maiores; DME, defeitos menores.

As análises do espermograma realizadas também indicaram pouca diferença estatística entre os grupos. A principal diferença foi apresentada quando comparadas as doses dos touros zebuínos com os taurinos, independente da estação do ano. O grupo dos zebuínos (*Bos taurus indicus*) apresentou maior média de concentração no ejaculado fresco, comparado aos taurinos (*Bos taurus taurus*),  $p=0,01$  (tabela 4d). Quando analisados separadamente, o grupo dos zebuínos, apresentou tendência em produzir ejaculado mais concentrados no verão do que no inverno,  $p=0,08$  (tabela 4b). O grupo isolado de taurinos (tabela 4a) e a comparação de todas as doses produzidas no inverno e verão, independente das raças dos touros (tabela 4c), não apresentaram diferenças significativas em relação aos defeitos morfológicos analisados.

**Tabela 4a.** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros de raça taurina produzidos no verão e no inverno.

	<b>VOL (ml)</b>	<b>CON (M/ml)</b>	<b>MPG (%)</b>
<b>Verão</b>	10,50 ± 2,28	773,00 ± 264,4	53,50 ± 7,72
<b>Inverno</b>	9,85 ± 3,64	808,00 ± 169,78	60,50 ± 3,11
<b>Valor P</b>	0,52	0,78	0,19

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T preado. VOL, volume do ejaculado fresco; CON, concentração do ejaculado fresco em milhões de células por ml; MPG; motilidade progressiva do ejaculado após congelamento.

**Tabela 4b.** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros de raça zebuína produzidos no verão e no inverno.

	<b>VOL (ml)</b>	<b>COM (M/ml)</b>	<b>MPG (%)</b>
<b>Verão</b>	11,50 ± 5,07	1462,00 ± 380,95	59,75 ± 6,85
<b>Inverno</b>	10,65 ± 6,25	1009,00 ± 309,80	61,50 ± 7,33
<b>Valor P</b>	0,77	0,08	0,78

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T preado. VOL, volume do ejaculado fresco; CON, concentração do ejaculado fresco em milhões de células por ml; MPG; motilidade progressiva do ejaculado após congelamento.

**Tabela 4c.** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros produzidos no verão e no inverno, independente da raça.

	<b>VOL (ml)</b>	<b>COM (M/ml)</b>	<b>MPG (%)</b>
<b>Verão</b>	11,00 ± 3,68	1117,50 ± 477,33	56,63 ± 7,54
<b>Inverno</b>	10,25 ± 4,75	908,71 ± 255,10	61,00 ± 5,24
<b>Valor P</b>	0,58	0,17	0,25

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T preado. VOL, volume do ejaculado fresco; CON, concentração do ejaculado fresco em milhões de células por ml; MPG; motilidade progressiva do ejaculado após congelamento.

**Tabela 4d.** Médias e desvios-padrões das variações das variáveis do espermograma do sêmen de espermatozoides de touros da raça taurina e zebuína, independente da estação do ano.

	<b>VOL (ml)</b>	<b>COM (M/ml)</b>	<b>MPG (%)</b>
<i>Bos taurus indicus</i>	11,08 ± 5,29	1235,71 ± 402,30	60,63 ± 6,63
<i>Bos taurus taurus</i>	10,18 ± 2,84	790,50 ± 206,68	57,00 ± 6,61
<b>Valor P</b>	0,67	0,01	0,29

Letras diferentes em uma mesma coluna significam média das diferenças estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando aplicado o Teste T (amostras independentes). VOL, volume do ejaculado fresco; CON, concentração do ejaculado fresco em milhões de células por ml; MPG; motilidade progressiva do ejaculado após congelamento.

## 6. DISCUSSÃO

As diversas variáveis avaliadas no presente trabalho dependem de uma espermatogênese e maturação epididimária adequadas. Assim, as diferenças encontradas entre as doses coletadas no verão e no inverno, retratam diferenças nestes processos.

Dentre as variáveis que apresentaram diferenças estão algumas variáveis morfométricas. Comparando apenas raças taurinas entre verão e inverno, a área (A) da cabeça espermática foi a única característica com diferença significativa ( $p=0,04$ ) (tabela 1a), demonstrando que a área das cabeças das células produzidas no verão é maior que no inverno. Além disso também foi demonstrado que o perímetro (P) também tende em ser maior no verão ( $p=0,08$ ). Na tabela 1b, que apresenta as diferenças morfométricas apenas das raças zebuínas entre o verão e inverno, também foi identificada uma tendência ( $p=0,06$ ) da largura das cabeças serem maiores durante o inverno, o que indica que as células tendem a ter um aspecto morfológico diferente no inverno e no verão. Lucio et al. (2016) também observaram um aumento na área, perímetro, largura e em outras características morfométricas da cabeça dos espermatozoides oriundos de touros que passaram por estresse calórico induzido por insulação escrotal. Esse aumento foi evidenciado principalmente nos espermatozoides coletados 7 dias após esse estresse calórico.

Como a área, perímetro e largura da cabeça da célula espermática estão associadas a morfologia da cabeça do espermatozoide, esse é um achado que está associado às diferenças nos defeitos maiores (defeitos de cabeça) entre células produzidas em estações quentes e frias durante o ano. Considerando que a cabeça do espermatozoide é formada basicamente pelo

núcleo celular, essa diferença morfométrica pode ser devido a descompactação cromatínica. Beletti, Costa e Guardieiro (2005) verificaram que espermatozoides com alterações cromatínicas podem apresentar aumento ou diminuição da área da cabeça. Isso ocorre porque a cabeça do espermatozoide de touro é de formato espatular, ou seja, bastante achatada. Assim, descompactações mais leves levariam ao aumento da área, pois a célula manteria o formato espatular e o aumento de volume ocorreria por expansão frontal e lateral. Já as descompactações mais intensas fazem com que a cabeça do espermatozoide tenda a ser esférica, aumentando intensamente o volume da cabeça, mas diminuindo a área quando visto em duas dimensões.

Os resultados expostos na tabela 1d demonstram bastante diferenças entre os dados de morfometria das células, porém não estão relacionados às estações do ano e sim com as raças dos animais. Nela podemos ver que as doses dos touros de raças taurinas apresentaram área (A), harmônica 2 de Fourier (F2), simetria látero lateral (SLL), descompactação média da cromatina (D) e heterogeneidade média da cromatina (H) maiores do que os touros zebuínos. Esse resultado está de acordo com o de Beletti, Costa e Viana (2005) que também compararam a morfometria da cabeça de espermatozoides de touros zebuínos e taurinos em Uberaba-MG. Principalmente em relação a área das cabeças, mostraram que os espermatozoides dos taurinos tendem a serem maiores. Segundo Brito et al. (2002 e 2004), essa diferença entre as subespécies pode estar relacionada ao território de clima tropical, onde estão os touros, uma vez que as raças taurinas, em relação a termorregulação testicular, são menos adaptadas a esse tipo de clima. No entanto, essa diferença pode estar associada simplesmente a constituição genética dos animais, independente da termorregulação.

Os locais de descompactação de cromatina mostraram que no grupo das raças taurinas em geral a descompactação de cromatina pode acontecer com mais frequência durante o inverno do que no verão. No verão as células normais (N), sem alterações de descompactação, foram mais frequentes do que no inverno ( $P=0,03$ ). Estes achados podem ser explicados pela menor adaptabilidade ao clima das raças taurinas descrita em Brito et al. (2002) e são compatíveis aos encontrados em touros que passaram por estresse calórico (LUCIO et al., 2016). Além disso, houve tendência ( $p=0,08$ ) em ocorrer mais descompactação do tipo metade basal (DMB) no período de inverno. Essa tendência de ocorrer mais DMB no inverno também foi notada quando comparou todas as doses produzidas no inverno com as do verão, ignorando as raças dos touros ( $p=0,09$ ). Também foi verificada uma maior quantidade ( $p=0,02$ ) de DMB em touros taurinos quando comparados a touros zebuínos. Este tipo de alteração cromatínica (DMB) não influenciou a taxa de clivagem e de blastocisto em rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos (HIRAIWA, 2015), demonstrando que não influencia o processo de fertilização e o

desenvolvimento embrionário inicial. Como a DMB foi encontrada em maior quantidade no inverno e não está relacionada a problemas de fertilidade, é possível que esse achado nada tem com a termorregulação testicular, sendo que sua presença seja fisiológica e não patológica.

Quanto as alterações de descompactação em doses produzidas em estações quentes e frias, Lucio et al. (2016) fizeram uma análise similar utilizando azul de toluidina e encontraram diferenças significativas e mais intensas para essas características, porém com touros que passaram por estresse calórico induzido por insulação, os quais não estavam em ambiente controlado como é feito em centrais de inseminação artificial. Essa diferença de metodologia pode ter sido crucial para as diferenças de resultados mostradas nesse trabalho, uma vez que utilizamos doses de touros alocados em uma central de sêmen, que possui ambiente controlado. Esses touros estão sempre monitorados por um veterinário, afim de garantir o maior conforto possível para o animal. Esses touros ficaram alojados em piquetes grandes em áreas de muito sombreamento e receberam banhos com água fresca ao longo dos dias quentes. Esses fatores podem ter contribuído para uma boa termorregulação e amenizado o estresse calórico desses animais nos dias quentes.

Em relação a morfologia dos espermatozoides, não houve diferenças entre verão e inverno quando as raças taurinas e zebuínas foram analisadas separadamente, porém ao comparar todas as doses independente das raças dos touros, os espermatozoides produzidos no inverno apresentaram mais células com morfologia normal do que no verão ( $p=0,05$ ), e as que foram produzidas durante o verão apresentaram mais defeitos menores na morfologia ( $p=0,05$ ). O que mostra que os meses mais quentes do ano interferiram na morfologia das doses estudadas, independente da raça. Esse mesmo aumento de defeitos menores durante o verão também foi observado por Koivisto et al. (2009), tanto em taurinos quanto zebuínos no sudeste do país. Essa alteração na morfologia representa interferência do clima na maturação dos espermatozoides durante a passagem pelo epidídimo. Dentre as alterações que o espermatozoide sofre na maturação epididimária está a retirada de gotículas citoplasmáticas da cauda, o que não pode ser realizado satisfatoriamente (KOIVISTO et al. 2009).

Quando comparadas todas as doses de taurinos com zebuínos também não houve diferença significativa em relação a morfologia. Porém analisando o espermograma dos touros, o grupo com todas as doses (inverno e verão) de *B. indicus* apresentaram maior concentração no ejaculado do que em *B. taurus* ( $p=0,01$ ), resultado também obtido por Brito et al. (2002). Quando analisadas as mesmas doses, separando-as pela produção de inverno e verão, não demonstraram nenhuma diferença estatística. Como os touros zebuínos possuem melhor termorregulação testicular, a diferença na concentração do sêmen no verão neste tipo de animal



pode estar relacionada a outros fatores, tais como menor volume de secreção das glândulas anexas ao aparelho reprodutor (próstata, glândula vesicular e glândula bulbouretral). Como no verão os animais zebuínos utilizam o mecanismo de sudorese mais intensamente que os taurinos para realizar sua termorregulação corpórea (JIAN et al., 2014), qualquer diminuição da perda de água em outros processos seria interessante.

## **7. CONCLUSÃO**

O clima pode influenciar a qualidade do sêmen produzido por animais na microrregião de Uberaba, em especial de animais taurinos (*Bos taurus taurus*), em que existe aumento de alterações morfométricas da cabeça e de compactação cromatínica dos espermatozoides e de defeitos morfológicos menores em doses produzidas no verão. Os touros zebuínos apresentam apenas maior número de defeitos menores no verão.

Comparando resultados encontrados no presente trabalho com outros da literatura, conclui-se que o manejo como extensas áreas de sombreamento e banhos frequentes ao longo dos dias quentes podem minimizar os efeitos climáticos na qualidade do sêmen.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. **J. Dairy Sci.**, v.66, n12, p.2606-2622, 1983.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)82135-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82135-3)
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **J. Cell Biol.**, v. 93, n. 2, p. 298-305, 1982.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.298>
- BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 56, n. S2, p. 230-234, 2000.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200006\)56:2+<230::AID-MRD3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+<230::AID-MRD3>3.0.CO;2-V)
- BALHORN R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biol.** v.8, n.9, p.227, 2007.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2 ed. São Paulo: Editora Manole, 1992, 629p.
- BARTH, A.D, OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989, p.294.
- BELETTI, M.E., COSTA, L.F., VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Anim. Reprod. Sci.**, v.85, n.1-2, p.105-116, 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.019>
- BELETTI, M.E., COSTA, L.F., VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotech. Histochem.**, v.79, n.1, p.17-23, 2004  
<https://doi.org/10.1080/10520290410001700774>
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.
- BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 398-402, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>
- BELETTI, M.E; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Braz. J. Genet.**, v.19, p.97-103, 1996.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M.. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. j. morphol. sci.**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

BELETTI, M.E., COSTA, L.F., VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Anim. Reprod. Sci.**, v.85, n.1, p.105-116, 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.019>

BRITO, L.F., SILVA, A.E., RODRIGUES, L.H., VIEIRA, F.V. DERAGON, L.A., KASTELIC, J.P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Anim. Reprod. Sci.**, v.70, n.3-4, 181-190, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00009-X)

BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v.61, n.3, p.511-528, 2004.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00231-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00231-0)

CAMPOS, M.N.G., JACOMINI, J.O., SAMPAIO, G.S.L., PINTO, D.A., ALVES, B.G., LEMOS, M.S.; BELETTI, M.E. Chromatin condensation and morphometry of the bovine sperm head after in vitro sperm selection and capacitation. **J. Appl. Anim. Res.**, v.41, n.1, p.87-92, 2013.  
<https://doi.org/10.1080/09712119.2012.738227>

CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal) **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CLERMONT, Y; TANG, X.M. Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. **Anat Rec.**, v. 213, n.1, p. 33-43, 1985.  
<https://doi.org/10.1002/ar.1092130106>

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; CERDA-FLORES, R.M.; FERNÁNDEZ, J.L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; ARAGÓN TOVAR, A.R. Localisation and quantification of alkali-labile sites in human spermatozoa by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridisation. **Andrologia**, v.47, n.2, p.221-227, 2015.  
<https://doi.org/10.1111/and.12250>

CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. In: X Workshop de Visão Computacional, 2014, Uberlândia. **Proceedings X Workshop de Visão Computacional**, p. 270-274, 2014.

TOSHIMORI, K.; EDDY, E. M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.). **Physiology of Reproduction**. 4 ed. Elsevier: London, 2014, p. 99-137,

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00003-X>

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **J. Androl.**, v.23, n.1, p.25-43, 2002.

<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>

FERNÁNDEZ, J.L.; MURIEL, L.; RIVERO, M.T.; GOYANES, V.; VAZQUEZ, R.; ALVAREZ, J.G. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. **J. Andro.**, v.24, n.1, p. 59-66, 2003.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review of cattle reproduction in tropics. Part 6. The Male. **Anim. Breed. Abs.**, v.59. p. 403-412, 1991.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **J. Pathol.**, v.175, n.4, p.369-379, 1995.

<https://doi.org/10.1002/path.1711750403>

HAMMADEH, M.E.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHIMDT, W.; STREHLER, E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Arch. Androl.**, v. 46, n.2, p. 99-104, 2001.

<https://doi.org/10.1080/01485010151093958>

HIRAIWA, S. H. 2015. **Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na produção in vitro de embriões**. 71f. Dissertação (Livre Docência) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T. Variation in the stock of testicular stem cells and in the yield of spermatogonial divisions in ram and bull testes. **Andrologia**, v.8, n.2, p 137-146, 1976.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1976.tb02122.x>

HUD N.V.; ALLEN M.J.; DOWNING K.H.; LEE J.; BALHORN R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.193, n.3, p.1347-1354, 1993.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1773>

JOHNSTON, J.E.; NAELAPAA, H.; FRYE, J.B. Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi crossbreed bulls exposed to high temperatures and humidities. **J. Anim. Sci.**, v.22, n.2, 432-443, 1963.

<https://doi.org/10.2527/jas1963.222432x>

JOHNSON, L. Efficiency of spermatogenesis. **Microsc. Res. Tech.**, v.32, v.5, p. 385-422, 1995.

<https://doi.org/10.1002/jemt.1070320504>

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p. 471-480, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00108-1)

JOHNSON, G.D.; LALANCETTE, C.; LINNEMANN, A.K.; LEDUC, F.; BOISSONNEAULT, G.; KRAWETZ, S.A. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v.141, n.1, p.21-36, 2011.  
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0322>

JIAN, W., DUANGJINDA, M., VAJRABUKKA, C., & KATAWATIN, S. Differences of skin morphology in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and their crossbreds. **Int. J. Biometeorol.**, v.58, n.6, p.1087-1094, 2013.  
<https://doi.org/10.1007/s00484-013-0700-9>

JONES, R. Spermiogenesis and sperm maturation in relation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F.; ENNE, G. et al. (Eds) **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, 1998, p.205-218.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Anim Reprod Sci**, 45, p.255-261, 1997.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01587-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01587-4)

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; PIERSON, R.A.; COULTER, G.H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Can. J. Vet. Res.**, v.65, n. 2, p.111-115, 2001.

KOIVISTO, M.B., COSTA, M.T., PERRI, S.H., VICENTE, W.R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reprod. Domest. Anim.** v.44, n.4, p.587-592, 2009.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01023.x>

LUCIO, A.C., ALVES, B.G., ALVES, K.A., MARTINS, M.C., BRAGA, F.S., MIGLIO, L., BELETTI, M. E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v.86, n4, p.924-933, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>

MALAMA E., ZERON Y., JANETT F., SIUDA M., ROTH Z., AND BOLLWEIN H. Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. **Theriogenology**, v.87, p.79-90, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.002>

MARTÍ, J.I., APARICIO, I. M., GARCÍA-HERREROS, M. Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.97-109, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.022>

MARTINS, M. C. **Avaliação da compactação de cromatina durante a maturação epididimária do espermatozoide de touro.** 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MENDONÇA, G.A. **Caracterização proteômica da matriz nuclear espermática suína.** 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

MENEGASSI S. R., J. O. BARCELLOS E. A. DIAS C. KOETZ G. R. JR PEREIRA V. PERIPOLLI C. MCMANUS M. E. CANOZZI, AND LOPES F. G. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in braford bulls. **Int. J. Biometeorol.**, v.59, n.3, p.357-364, 2015.  
<https://doi.org/10.1007/s00484-014-0847-z>

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v.139, n.2, p.287-301, 2010.  
<https://doi.org/10.1530/REP-09-0281>

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, n.3, p.387-392, 1982.  
<https://doi.org/10.1007/BF00493438>

NICHI M., BOLS P. E., ZÜGE R. M., BARNABE V. H., GOOVAERTS I. G., BARNABE R. C., AND CORTADA C. N. Seasonal variation in semen quality in bos indicus and bos taurus bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v.66, n.4, p.822-828, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.056>

NISHIMUNE, J.R; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. *Develop.* **Growth & Differ.** v.35, n.5 p.479-486, 1993.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1993.00479.x>

OLIVA, R; CASTILLO, J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. **Asian J. Androl.**, v.30, n.1, p.24-30, 2011.  
<https://doi.org/10.1038/aja.2010.65>

OLIVA, R; DE MATEO, S.; ESTANYOL, J. M. Sperm cell proteomics. **Proteomics**, v.9, n.4, p.1004-1017, 2009.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200800588>

OZKOSEM, B.; FEINSTEIN, S.I.; FISHER, A.B.; O'FLAHERTY, C. Absence of peroxiredoxin 6 amplifies the effect of oxidant stress on mobility and SCSA/CMA3 defined chromatin quality and impairs fertilizing ability of mouse spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.94, n.3, p.68, 2016.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137646>

RAHMAN, M. B.; SCHELLANDER, K.; LUCEÑO, N. L.; VAN SOOM, A. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v.113, p.102-112, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>

RATHKE, C.; BAARENDS, W.M.; JAYARAMAIAH-RAJA, S.; BARTKUHN, M.; RENKAWITZ, R.; RENKAWITZ-POHL, R. Transition from a nucleosome-based to a protaminebased chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. **J. Cell Sci.**, v.120(Pt 9), p.1689-1700, 2007.

<https://doi.org/10.1242/jcs.004663>

RAZAVI, S. M. et al. Comprehensive functional enrichment analysis of male infertility. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, art. num. 15778, 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16005-0>

RIBAS-MAYNOU J.; GARCÍA-PEIRÓ, A.; FERNÁNDEZ-ENCINAS, A.; ABAD, C.; AMENGUAL, M.J.; PRADA, E. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five diferente assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. **Andrology**, v.1, n.5, p.715-722, 2013

<https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x>

SKINNER, J.D.; LOUW, G.N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J. Appl. Physiol.**, v.21, n.6, p.1784-1790, 1966.

<https://doi.org/10.1152/jappl.1966.21.6.1784>

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: **Sperm Chromatin**. New York: Springer, , 2011, p.19-44.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2)

SHARMA, R.; MASAKI, J.; AGARWAL, A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. **Methods Mol. Biol.**, v.927, p.121-136, 2013.

STÄLHAMMAR E. M., JANSON L., AND PHILIPSSON J. Genetic studies on fertility in AI bulls. I. Age, season and genetic effects on semen characteristics in young bulls. **Anim. Reprod. Sci.**, v.19, n.1-2, p.1-17, 1989.

[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90042-0)

SOUZA, E.T.; SILVA, C.V.; TRAVENÇOLO, B.A.N.; ALVES, B.G.; BELETTI, M.E. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reprod. Biol.**, v.18, n.2, p.177-181, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.04.001>

TANII, I.; TOSHIMORI, K.; ARAKI, S.; OURA, C. Extra-Golgi pathway of an acrosomal antigen during spermiogenesis in the rat. **Cell Tissue Res.**, v.270, n.3, p. 451-457, 1992

<https://doi.org/10.1007/BF00645046>

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.; FREIDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertil. Steril.**, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47963-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47963-X)

VRIES, M.; RAMOS, L.; HOUSEIN, Z.; DE BOER, P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. **Biol. Open**, v1, n.5, p.446-457, 2012.

<https://doi.org/10.1242/bio.2012844>

WAITES, G.M.H. MOULE, G.R. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. **J. Reprod. Fertil.**, v.2, p.213-224, 1961.  
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0020213>

WARD, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 16, n. 1, p. 30-36, 2010.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>

WILDEUS S. AND HAMMOND A. C. Testicular, semen and blood parameters in adapted and nonadapted bos taurus bulls in the semi-arid tropics. **Theriogenology**, v.40, n.2, p.345-355, 1993.  
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90272-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90272-7)

WROBEL, K.H.; BICKEL. D.; KUJAT, R.; SCHIMMEL, M. Configuration and distribution of bovine spermatogonia. **Cell Tissue Res.**, v.279, n.2, p. 277-289, 1995.  
<https://doi.org/10.1007/BF00318484>

YÁNIZ, J.L., CAPISTRÓS, S., VICENTE-FIEL, S., SOLER, C., NÚÑEZ DE MURGA, M., SANTOLARIA, P. Use of relief Contrast objective to improve sperm morphometric analysis by Isas Casa system in the ram. **Reprod. Domest. Anim.**, v.48, n.6, p.1019-1024, 2013.  
<https://doi.org/10.1111/rda.12208>

YOSHINAGA, K.; TANII, I.; OH-OKA, T.; TOSHIMORI, K. Changes in distribution and molecular weight of the acrosomal protein acrin2 (MC41) during Guinea pig spermiogenesis and epididymal maturation. **Cell Tissue Res.**, v.303, n.2, p. 253-261, 2001  
<https://doi.org/10.1007/s004410000308>

YOSHINAGA, K.; TOSHIMORI, K. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. **Microsc. Res. Tech.**, v. 61, n.1, p.39-45, 2003  
<https://doi.org/10.1002/jemt.10315>

ZHAO, G.Q.; DENG, K.; LABOSKY, P.A.; LIAW, L.; HOGAN, B.L. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. **Genes Dev.**, v.10, n.13, p.1657-1669  
<https://doi.org/10.1101/gad.10.13.1657>