

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**SARA OLIVEIRA DOS REIS**

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES NAS DIFERENTES PORÇÕES DO  
TRATO REPRODUTIVO DO TOURO**

**UBERLÂNDIA**

**2021**

**SARA OLIVEIRA DOS REIS**

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES NAS DIFERENTES PORÇÕES DO  
TRATO REPRODUTIVO DO TOURO**

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Teresinha Inês de Assumpção

**UBERLÂNDIA**

**2021**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que é minha base e me deram forças e motivos para continuar mesmo com tantos obstáculos. Sem eles nada disso seria possível, agradeço imensa e eternamente.

À minha professora e orientadora, Teresinha, que me ajudou em cada etapa do processo e foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, que estiveram comigo nos momentos mais felizes e que continuaram ao meu lado nos momentos difíceis.

À minha banca, professora Renata e Mayara, pela disponibilidade e presença nesse dia.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos de espermatozoides de touros obtidos dos testículos, epidídimos e ductos deferentes, visando conhecer a maturação espermática na espécie. Os tratos genitais foram obtidos de animais de frigorífico, conduzidos ao laboratório de reprodução animal da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram dissecados e separados em porções. Os testículos receberam um corte transversal no terço médio e foram lavados internamente com solução de formol salina tamponada. As demais porções foram fatiadas e lavadas para que os espermatozoides fossem liberados. A avaliação morfológica utilizou lâminas coradas com rosa bengala e vermelho congo, verificando a porcentagem de anormalidades individuais das células. A porcentagem média de alterações dos espermatozoides encontradas no testículo, cabeça/corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente foram de 92,82%, 55,42%, 41,25% e 38,5%, respectivamente. Houve uma diminuição das anormalidades dos espermatozoides do testículo até o ducto deferente, mostrando assim o processo de maturação e seleção espermática.

**Palavras chaves:** Reprodução, bovinos, testículo, epidídimo, maturação espermática.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to characterize the morphological aspects of sperm of bulls obtained from testicles, epididymis and ductus deferens, in order to know the sperm maturation in the species. The genital tracts were obtained from frigorific animalstaken to the laboratory of animal reproduction of the Federal University of Uberlândia, where they were dissected and separated in portions. The testicles received a transversal cut in the middle third and were washed internally. The other portions were sliced and washed to release the spermatozoa.. Morphological evaluation used slides stained with rose bengal and Congo red, checking the percentage of individual cell abnormalities. The average percentage of spermatozoa abnormalities found in the testicles, epididymal head and body, epididymal tail and ductus deferens were 92.82%, 55.42%, 41.25% and 38.5% respectively, There was a decrease in sperm abnormalities from the testis to the ductus deferens, thus showing the process of sperm maturation and selection.

Keywords: spermatic morphology, epididymis, testicle, bull.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Espermatogênese	7
3.2 Epidídimo	9
3.3 Maturação espermática	10
3.4 Técnicas de coleta de espermatozoides no epidídimo	11
3.5 Técnicas para avaliação morfológica	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Animais	13
4.2 Coleta do sêmen	13
4.3 Análise Morfológica dos espermatozoides	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS	20

## 1. INTRODUÇÃO

Os bovinos, trazidos para o nordeste do Brasil por volta do século XVI, foram inicialmente usados como animais de tração nos engenhos. A criação começou a se expandir e a se tornar independente a partir do século XVII (ADAS, 1983). Hoje, a atividade se mostra cada vez mais importante para o crescimento econômico do país, sendo que a pecuária representou em 2020 cerca de 32% do PIB do agronegócio, o que corresponde a R\$ 640 bilhões/ano (CNA, 2020). A expectativa é que o Brasil registre em 2021 um rebanho bovino de 252,70 milhões de cabeças, sendo o maior rebanho comercial do mundo (FARMNEWS, 2021).

A grande quantidade de animais, no entanto, não garante uma boa produtividade. Para isso é indispensável tecnologias que possibilitem o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos, com foco tanto nas fêmeas como nos machos. O touro possui uma grande importância para melhorar a eficiência reprodutiva do rebanho, pois possibilita grande intensidade de seleção, uma vez que ele é capaz de disseminar seu material genético para uma grande quantidade de fêmeas (SANTOS et al., 2004).

A formação do espermatozoide ocorre no testículo e precisa passar por um processo de maturação no epidídimo para que tenha capacidade fecundante. O epidídimo é um longo ducto, altamente contorcido e é dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda que são responsáveis pela concentração, maturação, transporte e armazenamento dos espermatozoides (OLIVA et al., 2009).

Os espermatozoides epididimários possuem boa qualidade e é fonte de material genético, podendo ser utilizados em pesquisas de maturação espermática, na preservação do material genético de animais de alto valor zootécnico e para conservação de espécies ameaçadas de extinção (THOMASSEN; FARSTAD, 2009). Há diversos métodos de recuperação de espermatozoide do epidídimo para serem usados em técnicas de reprodução assistida, sendo que os gametas podem ser coletados de animais mortos ou pós orquiectomia (TURRI et al., 2013).

Para que ocorra a fertilização do oócito, o espermatozoide deve realizar diversas funções desde os desafios na formação no testículo (espermatogênese), o trajeto e maturação realizado no epidídimo e a passagem pelo trato reprodutivo feminino. O espermatozoide é uma célula altamente diferenciada e passa por processos complexos para chegar a esse

estágio (ARRUDA et al, 2015).A maturação espermática envolve diversos fatores complexos, dentre eles a aquisição da motilidade, alterações morfológicas espermáticas e interações com proteínas (BEDFORD, 1994). É necessário conhecer sobre essa maturação espermática no touro, para que se tenha cada vez mais sucesso no manejo reprodutivo deste animal, assim como nas técnicas utilizadas para a coleta de sêmen que visam aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos de espermatozoides de touros obtidos dos testículos, epidídimos e ductos deferentes, visando conhecer a maturação espermática na espécie e analisar a eficiência dos métodos de recuperação dos espermatozoides do testículo, epidídimo e ducto deferente.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Espermatogênese**

Os testículos possuem duas funções principais, uma exócrina que envolve a produção de células germinativas que são os espermatozoides e uma endócrina que está relacionada à produção de andrógenos (STAUB; JOHNSON, 2018). O processo de formação dos espermatozoides é denominado espermatogênese e consiste em uma série de divisões celulares sucessivas que se inicia na parede dos túbulos seminíferos e que transformam células germinativas diploides chamadas espermatogônias em um gameta masculino haploide (KUDRYAVTSEV et al., 2003).

O epitélio seminífero é formado por diversas gerações de células germinativas que formam camadas concêntricas com as células de Sertoli fazendo sua proteção. O citoplasma das células de Sertoli fica ao redor das células germinativas e é responsável pela nutrição e manutenção da associação celular durante a espermatogênese (HESS; FRANCA, 2008). A multiplicação das células germinativas ocorre por divisões mitóticas e posteriormente meiose, nesse processo há a duplicação de cromossomos, recombinação genética e a redução dos cromossomos que irá produzir células haploides esféricas que diferenciadas se tornam espermatozoides compactados que serão liberados no lúmen do túbulo seminífero (HESS;



FRANCA, 2008). Cada etapa desse processo de desenvolvimento é localizados no epitélio seminífero em suas diferentes porções, conforme há as divisões e transformações as células, antes menos diferenciadas, passam da lâmina basal do epitélio seminífero para o compartimento adluminal até a espermiacção no túbulo seminífero (MRUK; CHENG, 2004).

A espermatogênese em bovinos tem duração média de 60 dias e pode ser dividida em fases: 1) Espermatocitogênese que é caracterizada pelas divisões mitóticas das células germinativas para a produção de espermatogônias e espermatócitos primários; 2) A meiose que é a duplicação dos cromossomos que são responsáveis pela recombinação e segregação do material genético; 3) Espermiogênese que é a fase em que a espermatíde sofre alterações morfológicas e se diferencia em espermatozoide (RUSSELL et al., 1990; JOHNSON et al., 2000; LEITE, 2008).

No epitélio seminífero são encontradas associações celulares que formam o chamado “ciclo do epitélio seminífero” que pode ser definido como “uma série de modificações entre duas aparições de associação celular ou de estágios de desenvolvimento em determinada área do epitélio seminífero”. No touro ocorre doze associações distintas e a duração desse ciclo é em média 14 dias, para que uma célula tronco do primeiro ciclo (espermatogônia tipo A) complete sua diferenciação (GARNER; HAFEZ, 2004).

Na espermatocitogênese ocorre a divisão mitótica das espermatogônias A1 em células mais diferenciadas que são chamadas de A2, A3, intermediárias, B1 e B2. As células do tipo B2 se dividem e formam espermatócitos primários, estes por sua vez entram em meiose e originam as espermatídes esféricas e posteriormente se diferenciam em espermatozoides alongados na fase de espermiogênese (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

A espermiogênese é a transformação de espermatídes esféricas haploides em células altamente condensadas que são os espermatozoides maduros e possui quatro etapas de diferenciação: Fase de Golgi, fase de capa, fase acrossomal e fase de maturação (HESS; FRANCA, 2009). Na fase de Golgi ocorre a produção de vesículas e grânulos com componentes enzimáticos do sistema acrossômico que serão responsáveis por cobrir o núcleo do esperma que está sendo desenvolvido formando o acrossoma. Na fase de capa há a formação do capuz através da aderência dos grânulos ao envelope nuclear e ao achatamento da vesícula sobre a superfície nuclear e o desenvolvimento da cauda por alongamento dos

centríolos. Na fase acrossomal ocorre a migração do sistema acrossomal, condensação da cromatina e do acrossoma e alongamento do núcleo. Na fase de maturação ainda é possível observar a condensação do núcleo e da cauda que vão se tornando mais rígidas, o amadurecimento do acrossoma que cobre o núcleo e há a remoção do excesso de citoplasma (HESS; FRANCA, 2009).

### **3.2 Epidídimo**

O epidídimo é composto por um ducto longo e enovelado e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda, sendo localizado entre os testículos e os ductos deferentes. O trajeto dos espermatozoides por esse ducto leva aproximadamente de nove a treze dias no touro (DACHEUX, 2014).

A cabeça do epidídimo é formada por um epitélio pseudoestratificado com células ciliadas e um lúmen estreito que se encontra no polo cranial do testículo e é responsável pela absorção de fluídos e transporte dos espermatozoides. O corpo está posicionado na face laterodorsal do testículo, possui cílios encurvados e um lúmen mais largo, possibilitando maior concentração de espermatozoides que passam pela maturação e adquirem capacidade fecundante (SELIGMANN et al., 1992; SCHIMMING et al., 2012). Na cauda do epidídimo ocorre o armazenamento e seleção dos espermatozoides maduros até o momento da ejaculação, por essa razão, possui poucos cílios e um lúmen maior e se localiza na face caudal do testículo (BARTH; OKO, 1989; HAFEZ; HAFEZ, 2004; KNOBIL; NEIL, 2006).

O transporte dos espermatozoides pelo epidídimo é realizado através da contração dos músculos lisos da parede do segmento da cabeça e corpo e pelos cílios do epitélio. A musculatura da cauda só é estimulada a se contrair no momento da ejaculação, quando ocorre liberação dos espermatozoides (SOSTARIC et al., 2008).

Durante essa passagem pelo epidídimo o volume da célula espermática é alterado, há a condensação da cromatina nuclear, o acrossoma se torna mais rígido e a gota citoplasmática se move distalmente a partir do colo para a extremidade da cauda (BRACKETT, 2006). Há mudanças na composição lipídica e proteica da membrana do espermatozoide, novas proteínas são adicionadas, removidas, modificadas ou transferidas. A correta configuração molecular durante o processo de maturação no epidídimo e as modificações que ocorrem

possibilita a maturação completa do espermatozoide e faz com que ele seja capaz de fecundar o oócito (AKBARSHA; FAISAL, 2015).

### **3.3 Maturação espermática**

O espermatozoide se torna maduro apenas após o trânsito pelo epidídimo, onde adquire motilidade progressiva e se torna capaz de fecundar um oócito. A maturação é bastante complexa e envolve modificações nas características bioquímicas como a condensação da cromatina, modificação na composição das proteínas da superfície da membrana plasmática e troca de colesterol e fosfolipídios (GRANEMANN, 2006). Há também alterações funcionais na habilidade de ligação à zona pelúcida e no padrão da atividade do flagelo (GUASTI et al., 2012).

Cada região do epidídimo é responsável por uma fase importante da maturação. Na cabeça e corpo do epidídimo ocorre a reabsorção de grande parte dos fluidos vindos do túbulo seminífero, a maturação espermática responsável pela capacidade fecundante, aquisição de movimento vibratório, e movimento progressivo que dá à célula a habilidade de se ligar à zona pelúcida e realizar a fecundação e ainda a condensação da cromatina que é responsável pela proteção do DNA (SELIGMANN et al., 1992; SCHIMMING et al., 2012; GUASTI et al., 2012). Já a cauda é responsável pelo armazenamento, pré seleção e manutenção dos espermatozoides maduros até que estes sejam ejaculados (BARTH; OKO, 1989; HAFEZ; HAFEZ, 2004; KNOBIL; NEIL, 2006).

Além do ambiente epididimário diferenciado e suas diversas proteínas que garantem a manutenção e viabilidade espermática, a presença de fatores hormonais e um ambiente hiperosmótico com baixo teor de cálcio também fazem a manutenção da viabilidade espermática, conservando sua capacidade fecundante (HAFEZ; HAFEZ, 2004; HARRISON et al., 1992; DACHEUX et al., 2003).

Quando o espermatozoide é liberado no testículo, após a espermatogênese, ele ainda não possui movimentação própria e capacidade de fecundar (BARTH; OKO, 1989). No epidídimo ocorre a concentração espermática, a secreção de proteínas, aminoácidos, sais e cloretos responsáveis pela nutrição da célula e a maturação espermática que é responsável pelo desenvolvimento da capacidade fecundante dos espermatozoides durante seu trajeto (AKBARSHA; FAISAL, 2015). O espermatozoide sofre mudanças morfológicas,

bioquímicas e funcionais como a reorganização da membrana espermática e acrossoma aumentando sua resistência e estabilidade, há a migração da gota citoplasmática que deixa de ser proximal e passa a ser distal ou se perde e ocorre também a remoção seletivas das células com anormalidades (BRACKETT, 2006).

Os espermatozoides presentes no lúmen epididimário dependem da interação com proteínas e secreções que são reguladas pela testosterona para que aconteçam suas modificações e ocorra a maturação (RODRIGUEZ et al., 2001). A formação do espermatozoide no testículo é de aproximadamente sessenta e um dias e a passagem através do epidídimo é de oito a dez dias, ou seja, o espermatozoide se encontra pronto para ser ejaculado em aproximadamente setenta dias no caso dos bovinos. Esse espermatozoide é de boa qualidade e poderá ser recuperado do epidídimo para ser utilizado em programas de reprodução assistida sendo capaz de fertilizar o oócito (GONÇALVES et al., 2008).

### **3.4 Técnicas de coleta de espermatozoides no epidídimo**

A coleta de espermatozoides diretamente do epidídimo é uma importante técnica em casos de animais de alto valor genético que precisam passar pela orquiectomia, que vieram a óbito e/ou animais ameaçados de extinção. Esses espermatozoides recuperados são morfolologicamente viáveis e de alto nível de maturação, mantendo sua capacidade de fecundação e são usados em programas de reprodução assistida (GOODROWE; HAY, 1993; TSUTSUI et al., 2003). Os espermatozoides permanecem viáveis até a degeneração tecidual do epidídimo *post mortem* (BRUEMMER et al., 2002; MURADÁS et al., 2006), sendo que esse processo pode ser retardado por temperaturas mais baixas que diminuem o metabolismo dos espermatozoides e faz com que eles fiquem viáveis por mais tempo (GRANEMANN et al., 2006).

Os métodos para coleta dos espermatozoides no epidídimo são variados e dependem das características da espécie de interesse. Yu e Leibo (2002), descreveram a técnica de fatiamento como método de preferência para animais de pequeno porte, podendo ser também usada para se obter amostras de espermatozoides dos animais de produção (HISHINUMA et al., 2003). Nesse processo, a cauda do epidídimo é cortada ou fatiada e lavada para que os espermatozoides sejam recuperados. Uma técnica similar a essa consiste em fazer numerosos

cortes na cauda do epidídimo e pressionar para o extravasamento do líquido epididimário (TAMAYO - CANUL et al., 2011).

Segundo Martinez-Pastor et al. (2006), a técnica do fluxo retrógrado é usada para animais de produção (grande porte) devido ao tamanho do epidídimo, é a mais indicada por possuir menor nível de contaminação e melhor qualidade seminal se comparada a outras técnicas. Consiste em promover um fluxo retrógrado no epidídimo aplicando pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (GARDE et al., 1994). Tiplady et al. (2002) sugerem a adição de plasma seminal ou outro diluente que possua os componentes necessários para manter a viabilidade espermática sem que haja redução da motilidade.

### **3.5 Técnicas para avaliação morfológica**

A avaliação das amostras seminais é essencial para o sucesso dos programas de reprodução animal sendo realizadas análises da motilidade, concentração e morfologia (ARRUDA et al., 2011). A morfologia espermática é usada nos exames andrológicos para a seleção de reprodutores e a sua alteração pode ser causada por disfunções testiculares e epididimárias. As alterações na morfologia da célula espermática acontecem em acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (ARRUDA et al., 2015; LOVE, 2018; CHEN et al., 2019; DIAS et al., 2019).

Para o estudo da morfologia espermática é utilizada avaliação microscópica das alterações nos espermatozoides (FERNANDES et al., 2009). Essas alterações podem ser observadas utilizando esfregaços de sêmen corados com Wright, rosa de bengala, Giemsa, eosina-nigrosina, Karras, vermelho congo, entre outros, sob microscopia óptica ou preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associado ou não (SOUSA, 2013).

Para fazer a avaliação com os esfregaços corados, é necessário de dois a três esfregaços, que deverão ser corados segundo o protocolo para cada corante e analisado no microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, os defeitos devem ser contados em no mínimo 200 células e anotados individualmente (CBRA, 2013).

Para a preparação úmida faz-se a avaliação com uma gota da amostra de sêmen em lâmina recoberta com uma lamínula em um microscópio de interferência de fase ou de contraste de fase com aumento de 1000 vezes. Assim como no esfregaço corado, a análise é feita no mínimo em 200 células, anotando os defeitos de forma e estrutura e os classificando como defeitos maiores e menores (CBRA, 2013).

Atualmente, o padrão mais utilizado para avaliação morfológica divide as patologias espermáticas em defeitos maiores e menores (CBRA, 2013). Os defeitos maiores estão relacionados a problemas testiculares e infertilidade e os defeitos menores são os que têm menor impacto na fertilidade do animal, ambos devem ser considerados para a avaliação. A análise é feita com base nos defeitos de forma e estrutura e podem ser classificados em defeitos de cabeça e cauda (peça intermediária e principal). Os defeitos maiores na cabeça são: defeito de acrossoma, subdesenvolvido, cabeça isolada anormal, contorno anormal, estreita na base, piriforme, pequeno anormal e *pouch formation*. Os da peça intermediária são: gota citoplasmática proximal e pseudogota. Já na peça principal: cauda fortemente dobrada. Ainda há um defeito maior considerando a existência de formas teratológicas que se referem aos espermatozoides irregulares. Quanto aos defeitos menores, há a cabeça delgada, gigante, curta, larga, pequeno normal, cabeça isolada normal, defeitos de implantação da cauda, cauda dobrada, gota citoplasmática distal e cauda enrolada, retroaxial e abaxial (CBRA, 2013).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

A coleta do sêmen foi realizada a partir dos testículos/epidídimos de dez animais machos com idade desconhecida e não selecionados, oriundos do frigorífico comercial Luciana em Uberlândia, MG.

### **4.2 Coleta do sêmen**

Após a chegada dos testículos no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, foi feita uma lavagem com soro fisiológico para a limpeza e remoção

de resíduos. Os órgãos foram dissecados e separados em testículo, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente, como mostra a figura 1.

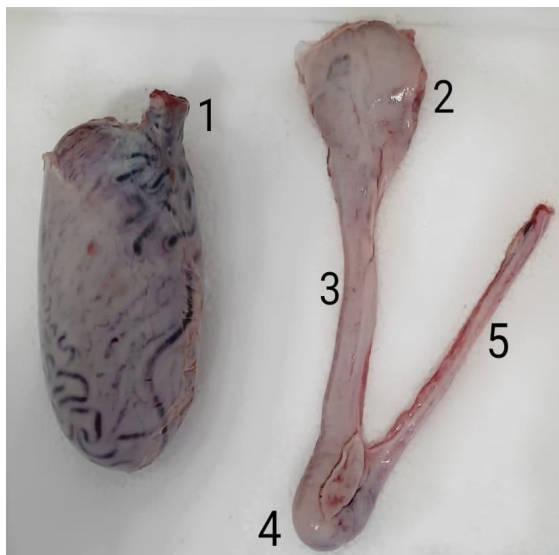


Figura 1. Preparação dos testículos e epidídimos dos touros e ductos deferentes. Testículo (1), cabeça do epidídimo (2) corpo do epidídimo (3), cauda do epidídimo (4) e ducto deferente (5).

Foi feito um corte transversal no terço médio dos testículos (figura 2A), que foram lavados internamente com formol salina tamponada. Para coletar o sêmen da cabeça/ corpo e cauda do epidídimo, assim como do ducto deferente, foi utilizado a técnica de fatiamento, sendo realizado diversos cortes (figura 2B) nessas porções, que foram posteriormente lavadas com a mesma solução e pressionadas para que os espermatozoides fossem liberados, os cortes e lavagens foram feitos em cada porção individualmente e em recipientes separados. Os líquidos coletados das lavagens foram acondicionados em tubos de 2ml. O formol salina foi utilizado para que as células fossem preservadas.

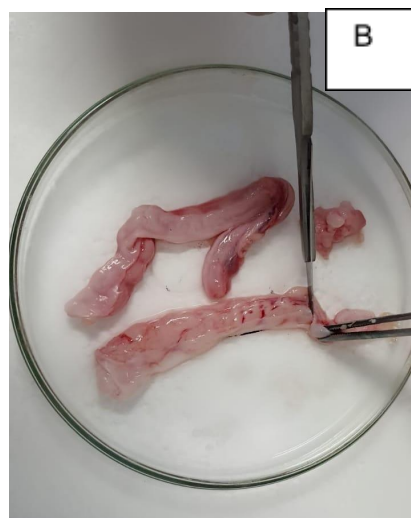
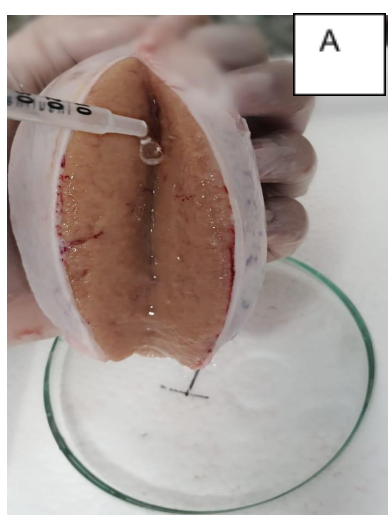


Figura 2. Coleta dos espermatozoides no trato genital de touros. A - Corte transversal no terço médio dos testículos, sendo lavado com formol salina. B - Fatiamento de cabeça/ corpo e cauda do epidídimo e do ducto deferente.

### 4.3 Análise morfológica dos espermatozoides

O método utilizado para a avaliação morfológica do sêmen foi a microscopia óptica através da preparação de lâminas coradas com rosa bengala e vermelho congo, contando um total de 200 células de cada porção do trato reprodutivo e analisando a porcentagem de anormalidades dos espermatozoides em sua cabeça, peça intermediária e cauda (CBRA, 2013).

As células foram analisadas e classificadas de acordo com a classificação de BLOM (1972), seguindo as recomendações do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013). Os espermatozoides foram classificados em defeitos maiores sendo os de cabeça, acrossoma, peça intermediária e peça principal: defeito de acrossoma, subdesenvolvido, cabeça isolada anormal, contorno anormal, estreita na base, piriforme, pequeno anormal e *pouch formation* e em defeitos menores como cabeça delgada, isolada normal, gigante, curta larga e pequena normal, gota distal, cauda dobrada e cauda enrolada, retroaxial e abaxial.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de coleta de lavagem do testículo e fatiamento do epidídimo e ducto deferente se mostraram eficientes para a recuperação dos espermatozoides, assim como demonstraram Hishinuma et al., (2003) que o fatiamento do epidídimo é uma técnica usada para obter amostras de espermatozoides dos animais de produção. A lavagem do testículo e o fatiamento do epidídimo e ducto deferente resultaram em amostras com alta concentração de células espermáticas e boa qualidade quando foram realizadas as análises.

A tabela 1 mostra as porcentagens de alterações morfológicas verificadas nas quatro porções analisadas nos animais estudados.

Tabela 1 - Médias das alterações morfológicas dos espermatozoides no testículo, cabeça/ corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente de touros.



ANORMALIDADE (%)	TESTÍCULO	CABEÇA / CORPO	CAUDA	DUCTO
		EPIDÍDIMO	EPIDÍDIMO	DEFERENTE
Defeito de Acrossoma	1± 0	0,5± 0	0,5± 0	-
Cabeça delgada	1± 0	-	0,5± 0	-
Cabeça isolada	8,1 ± 5,48	9,6 ± 5,44	12,75 ± 6,20	15 ± 6,33
Cabeça isolada patológica	1± 0	0,5± 0	0,5± 0	1± 0
Cauda dobrada	1,6 ± 0,89	3,62 ± 2,41	3,25 ± 1,30	7 ± 3,83
Cauda enrolada	29,1 ± 11,35	12,6 ± 8,73	7,5 ± 3,55	8,5 ± 7,41
Cauda fortemente enrolada	5 ± 5,65	1,37 ± 0,95	1 ± 3,40	1,5 ± 2,29
Contorno anormal	2 ± 1,06	0,5± 0	1± 0,28	0,5± 0
Forma teratológica	-	-	0,75± 0,33	-
Defeito de pi	2± 0	0,5± 0	-	0,5± 0
Gota citoplasmática distal	2,12 ± 1,35	11 ± 9,76	10,25 ± 14,39	2,5 ± 2,60
Gota citoplasmática proximal	15,4 ± 12,82	12,9 ± 12,02	2 ± 2,79	1,5± 0
Pequeno anormal	1± 0	0,5± 0	-	0,5± 0
Pequeno normal	1± 0	0,5± 0	-	-
Piriforme	-	0,5± 0	-	-
Retroaxial	1,5 ± 0,5	0,83 ± 0,57	1,25 ± 0,50	-
<b>TOTAL</b>	<b>71,82</b>	<b>55,42</b>	<b>41,25</b>	<b>38,5</b>

A figura 3 mostra as principais alterações morfológicas verificadas nos espermatozoides dos animais estudados.

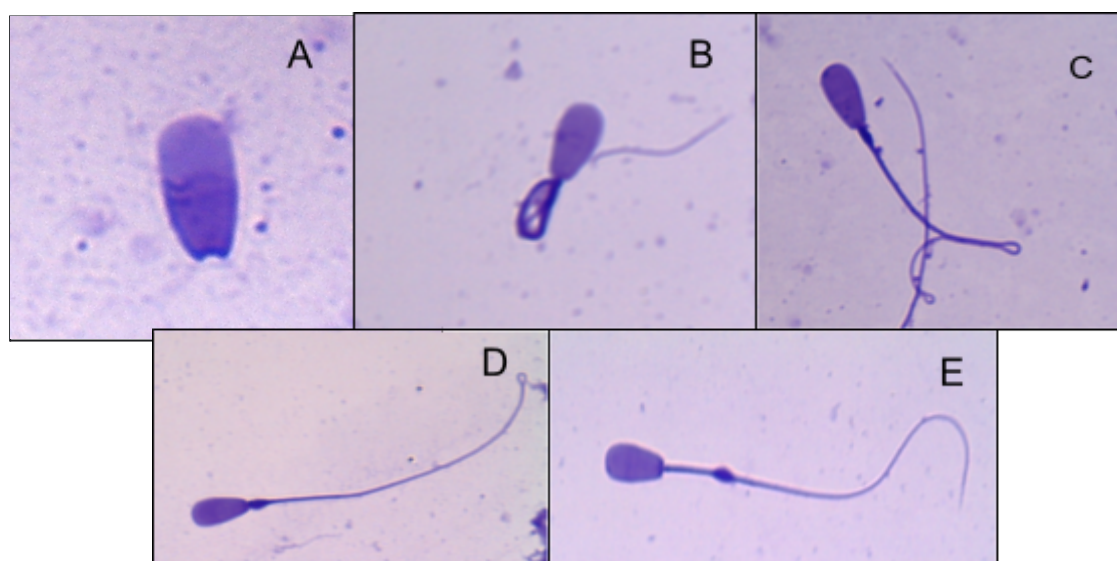


Figura 3 - Alterações morfológicas verificadas em maior quantidade nos espermatozoides dos touros. A - Cabeça isolada normal, B - Cauda fortemente dobrada ou enrolada, C - Cauda enrolada, D - Gota citoplasmática proximal, E - Gota citoplasmática distal.

A porcentagem média de alterações dos espermatozoides no testículo, cabeça e corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente foram de 71,82%, 55,42%, 41,25% e 38,5%, respectivamente. É possível observar na tabela 1 a ocorrência maior de alguns tipos de alterações nos espermatozoides das diferentes porções do trato reprodutivo do touro. Dentre as mais comuns estão: a cabeça isolada, cauda dobrada, cauda enrolada e fortemente enrolada, gota citoplasmática distal e proximal. Fernandes e Moraes (2009) demonstraram que cabeça isolada, cauda dobrada, cauda enrolada e cauda fortemente enrolada ou dobrada são defeitos comuns de serem encontrados no espermograma bovino.

Neste estudo observou-se um aumento da porcentagem média de cabeças isoladas durante a passagem das células pelo epidídimo que foi de  $8,1 \pm 5,48$  no testículo para  $15 \pm 6,33$  no ducto deferente. O aumento de espermatozoides com a cabeça isolada na cauda do epidídimo também foi observado por Dos Anjos (2006). As amostras utilizadas nesta pesquisa foram retiradas de testículos coletados no frigorífico e não se tem histórico dos animais abatidos, acredita-se que espermatozoides armazenados durante muito tempo, em consequência de inatividade reprodutiva, se fragmentam no epidídimo após adquirirem motilidade. Esses espermatozoides que permanecem por longos períodos no epidídimo reduzem a motilidade e vigor e aumentam a prevalência de defeitos de cauda e cabeça isolada normal (FERNANDES E MORAES, 2009). Outra alternativa para a ocorrência dessa alteração é a não formação completa da lâmina basal que não se conecta com a base da cabeça e gera uma instabilidade nessa região, é provável que durante o trajeto pelo epidídimo onde as células ganham motilidade e a gota citoplasmática migra para a extremidade distal essa ligação frágil seja rompida (BLOM; BIRCH-ANDERSEN, 1965; BARTH; OKO, 1989).

A tabela 1 também mostra o aumento de células espermáticas com a cauda dobrada e diminuição das células com a cauda enrolada provavelmente por adquirirem motilidade, o que também foi encontrado por Dos Anjos (2006), que constatou um aumento do número de espermatozoides com cauda dobrada e cabeças isoladas coletadas na cauda do epidídimo. Do

testículo ao epidídimo houve uma diminuição das gotas citoplasmáticas proximais, à medida que aumentou o número de gotas citoplasmáticas distais, Horn et al. (2002) também observou esse fato. A diminuição das gotas citoplasmáticas proximais ao longo do epidídimo pode ser explicada pela maturação espermática, onde ocorre a migração da gota citoplasmática proximal para a extremidade, a gota se perde ou fica distal.

Durante o trânsito epididimário houve a redução do número de defeitos em acrossoma, cabeça isolada patológica, contorno anormal, defeito de PI, pequeno anormal e piriforme, o que vai de acordo com Axner et al. (1999) e Sringam et al. (2011) que observaram a diminuição das porcentagens de cabeças espermáticas anormais, defeitos acrossomais e anormalidades da peça intermediária ao longo do epidídimo. Esse dado pode ser explicado pela remoção seletiva das células anormais que é a primeira limpeza realizada pelas células epiteliais dos ductos deferentes e macrófagos na cauda do epidídimo (SETCHELL, 1991; AXNÉR, 2006; SRINGAM et al., 2011).

A figura 4 mostra as porcentagens de defeitos morfológicos verificadas nas quatro porções analisadas nos animais estudados.

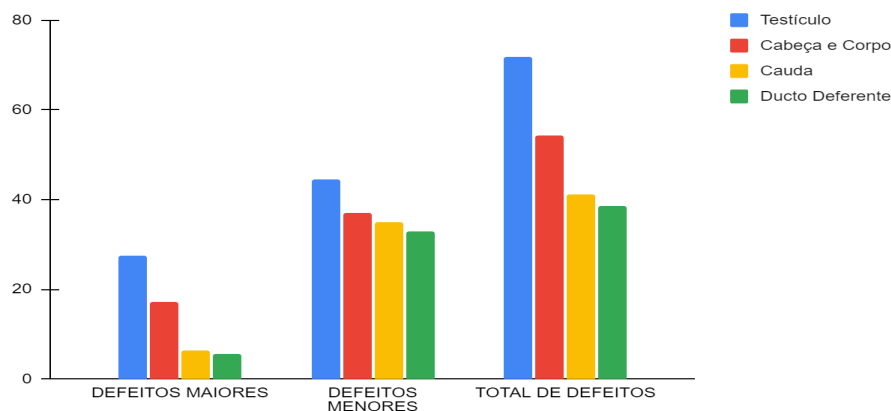


Figura 4 - Defeitos maiores, defeitos menores e totais de defeitos no testículo, cabeça/ corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente em touros.

Conforme mostrado na figura 4, o presente trabalho encontrou uma significativa diminuição dos defeitos totais (maiores e menores) durante a passagem pelo epidídimo, mostrando assim o processo de maturação celular após a saída do testículo. Reis et al (2015) obtiveram resultados diferentes quanto aos defeitos menores, que foram aumentando em direção a cauda do epidídimo. Silva et al (2003) verificaram que os espermatozoides têm

maior qualidade (menos defeitos) conforme vão percorrendo o trato reprodutivo, demonstrando mais uma vez a maturação espermática que ocorre nesse percurso e a fagocitose de células anormais feitas pelo epidídimo e ducto deferente.

## **6. CONCLUSÃO**

Os métodos de lavagem e fatiamento utilizados para a recuperação dos espermatozoides se mostraram eficientes para a obtenção de amostras de alta concentração e qualidade para as análises. Na análise morfológica foi possível observar a maturação espermática através da variação das anormalidades encontradas do testículo até o ducto deferente dos animais.

## REFERÊNCIAS

- ADAS, M. Panorama Geográfico do Brasil. São Paulo: **Moderna**, 1983, 241p.
- AKBARSHA, M.A.; FAISAL, K.; RADHA, A. The epididymis: structure and function. In: Singh, S.K. (ed) **Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology**, CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 119–120, 2015.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal Animal Science**, v.57, supl. 2, p.380-403, 1983.
- 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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- ARRUDA, R.P; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R.; SANTOS, G.C.; LEITE, T.G., OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.39, n.1, p.47-60, 2015.
- AXNÉR, E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 14-24, 2006.
- AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 767-778, 1999.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989, 285p.
- BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, p.2187-2199, 1994.
- BRACKETT, B.G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. in: REECE, W.O. **Dukes-Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.623-643, 2006.
- BRUEMMER, J.E., REGER, H., ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.405-407, 2002.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013,104 p.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Panorama do Agro. 2020**. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 06 de outubro de 2021.

CHEN, F.; GAO, L.; ZHOU, H; GUO, L.; CHEN, Q.; GAN, Y.; SUN, X.; LI, Q.; WANG, K. The association between sperm head elongation and semen quality. **Andrology**, v.7, p.840-845, 2019.

DACHEUX, J. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Review Reproduction**, v. 147, p.1470–1626, 2014.

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

FARMNEWS. Maiores rebanhos de bovinos por país: perspectiva revisada para 2021: dados de julho. 2021. Disponível em: <https://www.farmnews.com.br/mercado/maiores-rebanhos-de-bovinos-por-pais-perspectiva-revisada-para-2021/>. Acesso em 01 de outubro de 2021.

FERNANDES, C.E.; OLIVEIRA, A.R.; MIRANDA, P.D.A.B.; LOPES, S.D.C.P.; SILVA MORAES, S.; GRAÇA MORAIS, M.; CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Alterações na morfologia espermática em touros de corte com e sem suplementação de zinco na mistura mineral. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, p.1074-1083, 2009.

FERNANDES, C.E.; MORAES, J.C.F. Avaliação Clínica e Exame de Sêmen no Touro. **Fertilidade, Funcionalidade e Genética de Touros Zebuínos**. 1 ed. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2009.

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from *postmortem* rams. **Theriogenology**, v.41, p.2003, 1994.

GARNER, D.L; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: Hafez ESE, Hafez B. (Ed.) **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, p.97-110, 2004.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

GRANEMANN, L.C. **Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós orquiectomia**. 2006. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GRANEMANN, L.C., WEISS, R.R., KOZICKI, L.E., MUDARÁS, P.R.; TREML, T.E. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina

artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**. v.11, p.73-77, 2006.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.169-180, 2012.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Editora Manole. 7 ed., p. 97-110, 2004.

HARRISON, R.A.; JACQUES, M.L.; MINGUEZ, M.L.; MILLER, N.G. Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. **Journal of Cell Science**, v. 102, p.123-132, 1992.

HESS, R.A.; FRANCA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Advanced Experimental Medical Biology**. V.636, p.1-15, 2008.

HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. **Theriogenology**. v.59, p.813-820, 2003.

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.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.471-480, 2000.

KUDRYAVTSEV, I.V.; SAFRONOVA, L.D.; KUDRYAVTSEV, P.I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal Development Biology**, v.34, p.337-346, 2003.

KNOBIL, E.; NEILL, J.D., Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**. 3ed. United of America: Elsevier, 2006, 3191p.

LEITE, T.G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro**. 2008. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

LOVE, C.C. Sperm quality assays: How good are they? The horse perspective. **Animal Reproduction Science**, v.194, p.63-70, 2018.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MACIAS, V.G.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, p.471-485, 2006.

MUDARÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**. v.11, p.69-74, 2006.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrinology Reviews**, v.25, p.747-806, 2004.

OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.419-425, 2009.

REIS, J.R.; CAVALERO, T.C.; JACOMINI, J.O. **Morfologia espermática de touros Nelore, Pantaneiro e Curraleiro avaliada de amostras coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos**. 2015. Monografia – Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

RODRIGUEZ, C.M.; KIRBY, J.L.; HINTON, B.T. Regulation of gene transcription in the epididymis. **Reproduction**, v.122, p.41-48, 2001.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S.; CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990. 284p.

SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA FILHO, J.M. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro:vaca. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.497-503, 2004.

SCHIMMING, B.C.; PINHEIRO, F.F.P.; VICENTINI, C.A.; DOMENICONI, R.F. Ultrastructure of the epithelium lining of cauda epididymidis in mongrel dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p.32–36, 2012.

SELIGMAN, J.; KOSOWER, N.S.; SHALGI, R. Effects of caput ligation on rat sperm and epididymis: protein thiols and fertilizing ability. **Biology of Reproduction**, v.46, p.301-308, 1992.

SETCHELL, B.P. Male Reproductive Organs and Semen. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in Domestic Animals**. 4 ed. San Diego, CA: Academic Press, 1991. cap. 6, p. 234 – 238.

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 europeias e zebuínas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1218-1222, 2009.



SOUSA, P. C. ESTUDO DOS DANOS MORFOFUNCIONAIS CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO NO SÊMEN DE TATU-PEBA, *Euphractus sexcinctus* WAGLER, 1830. **Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA**, 2013.

SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, v.3-4, p.237-248, 2008.

SRINGNAM, S.; KITIYANANT, Y.; LEWIN, L. M.; SAIKHUN, K. Semen quality and chromatin condensation in domestic cat sperm during passage through the epididymis. **Kasetsart Journal (Nature Science)**, v. 45, p. 46-58, 2011.

STAUB, C.; JOHNSON, L. **Review: Spermatogenesis in the bull**. *Animal*, v.12, p.27-35, 2018.

TAMAYO-CANUL, J.; ALVAREZ, M.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; NICOLAS, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, E., ANEL, L.; Paz, P. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Animal Reproduction Science**, v.126, p.76-82, 2011.

TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: prefreeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v.58, p.225-228, 2002.

TURRI, F.; MADEDU, M.; GLIOZZI, T.M; GANDINI, G.; PIZZI, F. Effect of testicle post mortem storage on goat frozen-thawed epididymal sperm quality as a tool to improve genebanking in local breeds. **Animal**, v.8, p.440–447, 2013.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 190-199, 2009.

YU, I.; LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. **Theriogenology**, v.57, n.3, p.1179-1190, 2002.