



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

MORFOMETRIA DO NÚCLEO ESPERMÁTICO ASSOCIADA À AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA TESTICULAR EM BOVINOS

Débora Carvalho Meldau

CAMPO GRANDE, MS
2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**Morfometria do núcleo espermático associada à avaliação histológica
testicular em bovinos**

Morphometry of the sperm nucleus associated with testicular histological evaluation
in bovine

Débora Carvalho Meldau

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS 2013

DÉBORA CARVALHO MELDAU

**"MORFOMETRIA DO NÚCLEO ESPERMÁTICO ASSOCIADA À AVALIAÇÃO
HISTOLÓGICA TESTICULAR EM BOVINOS"**

**"Morphometry of the sperm nucleus associated with testicular histological
evaluation in bovine"**

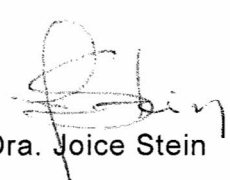
Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
parte dos requisitos do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal para
obtenção do título de Mestra.

Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 08/03/2013



Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
Orientador



Dra. Joice Stein



Dr. Helder Silva Luna

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos ao Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, meu orientador, pelos ensinamentos, auxílio, tolerância e convívio.

À equipe do laboratório de Patologia pelo carinho com que me acolheu, pela amizade que construímos e pelo conhecimento a mim compartilhado.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico, administrativo e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Por fim, um agradecimento especial aos meus pais, namorado e amigos, que nesse processo inquietador de elaboração de uma dissertação sempre tiveram sempre uma palavra de incentivo nos momentos de desânimo e dificuldade.

Muito obrigada a todos!



Resumo

AUTOR, Meldau D.C. Morfometria do núcleo espermático associada à avaliação histológica em bovinos. 2013. 26 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

O objetivo deste trabalho foi analisar a histologia testicular e o perfil morfométrico nuclear espermático em touros de corte diagnosticados como aptos ($n=7$) e inaptos ($n=7$) quanto ao potencial reprodutivo. Esfregaços corados pelo método citológico rápido foram usados para mensurações nucleares diretas (base (μm), largura (μm), comprimento (μm), perímetro (μm) e área (μm^2)) e indiretas (índice de circularidade (0-1), índice de alongamento (0-1)), de 50 células espermáticas. Fragmentos testiculares obtidos pós orquiectomia foram usados para análise histológica. Segmentos tubulares ($n=100/\text{touro}$) foram classificados de acordo com integridade tubular, disposição das células germinativas, presença de alterações descamativas e necrose intratubular. O percentual de túbulos contendo espermátides alongadas e/ou espermatozoides foi usado como indicador meiótico. Touros aptos apresentaram maior frequência de integridade tubular (38,2%) e índice meiótico (29,4%) em relação aos inaptos (8,8% e 6,6%, respectivamente). Com exceção do comprimento, todas as outras variáveis morfométricas diferiram significativamente entre as condições reprodutivas. O comprimento, circularidade, largura e base foram as variáveis que melhor explicaram a variação da área nuclear espermática ($R^2=0,80$, $p<0,01$) nos touros aptos. Para os inaptos, o comprimento, a circularidade e a base foram as mais significativas ($R^2=0,67$, $p<0,01$). Concluiu-se que touros com cerca de 30,0% de segmentos tubulares comprometido estruturalmente podem ser considerados subférteis e, portanto, inaptos à reprodução. Nesses indivíduos, além das alterações histológicas, há maior proporção de defeitos de cabeça e formação de maior heterogeneidade na área do núcleo espermático, sugestivo de imaturidade na condensação da cromatina.

Palavras-chave: Morfometria espermática, avaliação histológica, sêmen, bovino.



Abstract

AUTOR, MELDAU D.C. Morphometry of the sperm nucleus associated with testicular histological evaluation in bovine. 2013. 26 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

The aim of this study was to analyze the testicular histology and morphometric profile of sperm nucleus from beef bulls classified according its reproductive condition in satisfactory ($n = 7$) and unsatisfactory ($n = 7$). Sperm smears were stained by Diff-Quick for the nuclear measurements. It was analysed direct (base (μm), width (μm), length (μm), perimeter (μm), area (μm^2)) and indirect (index circularity (0-1), index of elongation (0-1)) nuclear measurements from 50 sperm cells. Testicular fragments obtained after orchiectomy were used for histological analysis. Tubular segments ($n = 100/\text{bull}$) were classified according tubular integrity, germ cells arrangement, presence of abnormal desquamation and intratubular necrosis. The percentage of tubules containing elongated spermatids and/or spermatozoa was used as an meiosis indicator. Satisfactory bulls had a higher frequency of tubular integrity (38.2%) and meiotic index (29.4%) compared to unsatisfactory ones (8.8% and 6.6%, respectively). Except length, all other morphometric variables differed significantly between reproductive conditions. Length, roundness, width and base were the variables that best explained the variation in sperm nuclear area ($R^2 = 0.80$, $p < 0.01$) in satisfactory bulls. For the unsatisfactory ones, length, roundness and base were the most significant measurements ($R^2 = 0.67$, $p < 0.01$). We concluded that bulls with about 30.0% of structurally compromised tubular segments can be considered subfertile and thus unsatisfactory to reproduce. These individuals apart from histological changes there is more proportion of defects in head formation and more heterogeneity in the area of sperm nucleus, indicative of immaturity in chromatin condensation.

Keywords: Sperm morphology, histologic evaluation, semen, bovine.



Lista de ilustrações

Figura 1 – Aspectos histológicos de segmentos transversais tubulares em bovinos.....	23
Figura 2 - Média e erro padrão das frequências dos segmentos de túbulos seminíferos de bovinos classificados de acordo com as características histológicas qualitativas e quantitativas, com base na condição reprodutiva.....	24
Figura 3 – Representação do valor residual da área do núcleo espermático resultante dos modelos de regressão múltipla observada e valor residual predito de acordo com a condição reprodutiva em bovinos.....	26



Lista de tabelas

Tabela 1 - Média, erro padrão da média (epm) e intervalo de confiança (IC) das características seminais de bovinos de acordo com a condição reprodutiva.....	25
Tabela 2 - Média ajustadas, erro padrão da média (epm) e intervalo de confiança (IC) para variáveis morfométricas de bovinos de acordo com a condição reprodutiva.....	25
Tabela 3 - Modelos de regressão linear múltipla (método <i>stepwise</i>), associados à área do núcleo espermático em bovinos, de acordo com a condição reprodutiva.....	25



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Exame Andrológico.....	1
1.2. Morfologia espermática.....	2
1.3. Espermatogênese.....	3
1.4. Alterações Testiculares.....	5
1.5. Degeneração Testicular.....	5
1.6. Hipoplasia Testicular.....	6
1.7. Avaliação Histológica Testicular.....	7
1.8. Morfometria Espermática.....	8
REFERÊNCIAS.....	9
MORFOMETRIA DO NÚCLEO ESPERMÁTICO ASSOCIADO À AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA TESTICULAR EM BOVINOS.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	20

INTRODUÇÃO

Na última década, o Brasil se tornou o maior exportador e o segundo maior produtor de carne bovina do mundo. Acompanhando o crescimento da pecuária no Brasil, é necessário que haja o surgimento de novas tecnologias que levem à maximização do aproveitamento do potencial produtivo dos animais. Embora tenha havido avanços nos modelos propostos para melhorar a eficiência dos sistemas produtivos, as taxas de descarte de reprodutores por problemas reprodutivos e baixa qualidade seminal ainda são preocupantes.

Considerando a fertilidade como uma variável multifatorial, é possível inferir que, em muitas situações, o exame andrológico convencional não seja suficiente para diagnosticar e prognosticar alterações na função reprodutiva (Beletti et al., 2004). Portanto, novas técnicas semiológicas, especialmente de baixo custo, devem ser estudadas e/ou incorporadas à rotina de seleção e avaliação andrológica, buscando identificar mais acuradamente subpopulações de indivíduos potencialmente subférteis.

A análise de importantes defeitos, como os de cabeça e de núcleo espermático, na avaliação do sêmen bovino, ainda é baseada em microscopia de campo claro. Embora seja rápida e útil para o diagnóstico, é passível de erros por não permitir a identificação e quantificação de pequenas variações entre subpopulações espermáticas. Ambos os defeitos são os mais importantes para o diagnóstico e prognóstico das alterações reprodutivas no touro (Ostermeier et al., 2001; Walters et al., 2005), porém sua relação nem sempre pode ser estimada em termos de fertilidade. Nesse contexto, diferentes defeitos morfológicos na estrutura nuclear como contorno, forma da cabeça espermática e compactação da cromatina, têm sido empregados com o objetivo de identificar diferenças entre indivíduos e seu impacto sobre a fertilidade (Ostermeier et al., 2001). Desta forma, a morfometria digital tem obtido resultados promissores com relação à estimativa de diferentes medidas do núcleo espermático e relação com anormalidades na cromatina (Gravance et al., 1996; Fernandes et al., 2005; Silva et al., 2008).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Exame Andrológico

O exame andrológico é essencial para a avaliação do potencial reprodutivo de um touro, visando estabelecer um diagnóstico e/ou uma conclusão com relação ao aproveitamento do animal. Desta forma, o exame andrológico tem como objetivo maximizar a fertilidade do rebanho ao oferecer a possibilidade de eliminação de touros inférteis do rebanho, selecionando, possivelmente, os animais que apresentam maior eficiência reprodutiva. A avaliação dos reprodutores é

fundamentada na observação da saúde geral do animal, saúde do sistema reprodutivo e determinação da potencialidade reprodutiva.

Indo ao encontro do que foi anteriormente exposto, as avaliações clínicas seminais tornam-se, portanto, fundamentais para classificar e estabelecer um prognóstico da função reprodutiva. O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998) recomenda classificar os reprodutores em três categorias, de acordo com o diagnóstico, sendo que os touros podem ser aptos ou satisfatórios, inaptos temporários ou questionáveis e insatisfatórios ou inaptos à reprodução.

O touro considerado inapto (condição permanente) não deve ser utilizado como reprodutor. Em animais aptos e inaptos temporários ou questionáveis (condições temporárias) devem ser realizados com regularidade exames de sêmen, uma vez que fatores nutricionais, raciais, ambientais, farmacológicos, sanitários ou de manejo podem levar a alterações nos padrões seminais.

Crítérios e padrões têm sido estabelecidos visando facilitar a conclusão a respeito das características seminais observadas no exame andrológico. O espermograma, exame que analisa a qualidade de células espermáticas no sêmen, consiste em um dos principais métodos para estimar a fertilidade do macho e, portanto, tem sido considerado um dos melhores indicadores de potencial de fertilidade (Belletti et al., 2004).

Divide-se o espermograma em duas fases: exame imediato e exame laboratorial. No primeiro, a avaliação é realizada logo após a colheita do sêmen, observando-se volume, aspecto e as variáveis cinéticas que envolvem turbilhonamento, motilidade e vigor.

Com relação às avaliações laboratoriais, são obtidos fatores quantitativos e qualitativos significativos para a avaliação da qualidade do sêmen. Quantitativamente, estima-se a concentração de células e, qualitativamente, a morfologia espermática, de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

1.2. Morfologia Espermática

A morfologia espermática trata-se de um componente essencial para o exame de sêmen, capaz de fornecer uma estimativa do percentual de espermatozoides normais ou íntegros estruturalmente, bem como a distribuição dos distintos defeitos morfológicos. Contudo, é importante salientar que o espermograma reflete a produção espermática de 60 a 70 dias passados, de certa região do túbulo seminífero, sendo, desta forma, possível apenas apontar um prognóstico do potencial da capacidade reprodutiva (Reichenbach et al., 2008).

De uma forma geral, a morfologia espermática é analisada utilizando-se esfregaços corados e fixados, ou por meio da câmara úmida (CBRA, 1998), sendo a primeira preferível, uma vez que os espermatozoides são células translúcidas.

Desde que foram classificados os defeitos morfológicos espermáticos no touro, tem sido despendido muito esforço no estudo da importância e impacto na fertilidade do touro da patologia espermática (Rao et al., 1980; Barth et al., 1992; Saacke, 2000; Ostermeier et al., 2001).

Com relação às células espermáticas morfológicamente alteradas, a classificação pode ser feita de acordo com a estrutura envolvida como cabeça, incluindo o acrossomo, e cauda, envolvendo também defeitos de peça intermediária (CBRA, 1998), ou ainda simplesmente dividida em defeitos maiores e defeitos menores (Blom, 1973), sendo o defeito associado ao grau de importância do defeito para a fertilidade.

Devem ser contadas 200 células espermáticas e classificadas de acordo com a sua morfologia. Os espermatozoides normais devem representar, no mínimo, 70% da totalidade das células espermáticas contadas, enquanto que os defeitos maiores não devem ultrapassar 20% e os defeitos menores não devem ultrapassar os 30%. No que diz respeito aos defeitos individuais, é preferível que os defeitos menores estejam em torno de 5% e defeitos menores ao redor de 10% (CBRA, 1998).

Simplificadamente, alguns dos defeitos morfológicos de importância para a avaliação seminal compreendem defeitos de cabeça, incluindo os de acrossomo e cabeça isolada normal, e de cauda, tanto de peça intermediária quanto de peça principal (CBRA, 1998).

Os defeitos de cabeça compreendem as alterações de forma, contorno e tamanho da cabeça espermática e estão intimamente relacionados a anormalidades na condensação da cromatina espermática, além de influenciarem na redução da fertilidade (Ostermeier et al., 2001) e na baixa taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário (Walters et al., 2005). Alterações na constituição do acrossomo costumam apresentar baixa prevalência, mas, quando presentes, podem prejudicar a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Thundathil et al., 2000).

Já os defeitos de cauda são os mais comumente encontrados no sêmen bovino e dificultam a motilidade ou o deslocamento dos espermatozoides que os possuem (Freneau, 2011). Habitualmente acompanham os processos degenerativos testiculares em associação com os demais defeitos. Além disso, touros com hipoplasia testicular tendem a apresentar maior prevalência de defeitos de cauda, bem como os que apresentam alterações epididimais (Amann & Hammerstedt, 1993).

1.3. Espermatogênese

Espermatogênese é o processo iniciado na periferia do túbulo seminífero e evolui em direção a luz deste, sendo composto por uma complexa série de divisões e diferenciações celulares, nas quais células diplóides (espermatogônias) se diferenciam em uma célula haplóide madura (espermatozoide) (Setchel, 1978). Três fases caracterizam esta transformação, que são: a espermatocitogênese, a fase meiótica e a espermiogênese. A primeira fase, a espermatocitogênese,

resulta na produção de espermatogônias, que se transformam em espermatócitos primários e secundários. Por conseguinte, essas células entram na segunda fase da espermatogênese, que compreende duas divisões meióticas consecutivas, responsáveis por reduzir o conteúdo de DNA à metade das células somáticas, levando à formação de células haplóides, chamadas de espermátides. A terceira fase, conhecida por espermiogênese, na qual há condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozoide ou aparelho flagelar e desenvolvimento do capuchão acrossomático, culminando na transformação das espermátides em espermatozoides (Johnson et al., 2000). No touro, as fases de espermatocitogênese, meiose e espermiogênese duram em média 21, 23 e 17 dias, respectivamente, totalizando 61 dias (Amann, 1970).

No início do século XXI, com o objetivo de facilitar a análise histológica, Horn et al. (2003) agruparam os estágios em três grupos, tendo como base a multiplicação mitótica (estágio I e II), as divisões meióticas (estágios III e IV) e a espermiogênese (estágios V ao VIII).

Apesar de todas as fases serem importantes para moldar a célula espermática, a espermiogênese tem sido a mais estudada. Isso se deve, principalmente, pela necessidade de conhecimentos sobre o reordenamento das organelas, migração mitocondrial, organização e compactação da cromatina nuclear. As espermátides caracterizam-se por apresentar núcleo esférico envolto por citoplasma, com destaque para o complexo de Golgi, mitocôndrias e centríolo. Diminutos corpúsculos, referenciados por grânulos pró-acrossômicos, unem-se para originar um simples grânulo maior, o qual se torna estritamente aderido à superfície nuclear (Russel et al., 1990). Subsequentemente, este grânulo expande-se ao longo do núcleo, dando origem ao sistema acrossomal, cuja função primordial é a secreção de material glicoproteico. Enquanto o sistema acrossomal migra para um pólo do núcleo, os centríolos, intimamente ligados à membrana nuclear, migram em direção oposta, dando origem ao flagelo ou cauda espermática. Por conseguinte, ocorre a rotação do núcleo e o sistema acrossomal se orienta em direção a membrana limitante do túbulo seminífero. Esta reorientação é acompanhada pelo deslocamento do próprio núcleo para a periferia do citoplasma (Fawcett, 1970).

Após essa importante etapa, a cromatina nuclear começa a condensar e torna-se mais cromofílica (Fawcett, 1970; Russel et al., 1990). Segundo Berndson & Desjardins (1974), na primeira divisão meiótica (espermatócitos primários) há 6% de perda celular por degeneração e, na segunda divisão (espermatócitos secundários) a degeneração fica próxima de 20%. Essa característica, embora seja fisiológica, está ligada à reorganização da cromatina nuclear ou a possíveis mecanismos de reparação no DNA (Baarends et al., 2001).

1.4. Alterações Testiculares

Diversas alterações clínico-patológicas têm sido identificadas no aparelho reprodutivo do touro e comumente estão relacionadas à redução da fertilidade, tanto de forma temporária quanto definitiva. O impacto maior dessas alterações incide sobre a função testicular, afetando diretamente a espermatogênese e, portanto, modificando os padrões seminais e possivelmente comportamentais. Alterações reconhecidas como clássicas, tais como a degeneração e a hipoplasia testicular, ainda constituem as principais patologias envolvidas com a inaptidão no touro (Foster, 2007). Outros processos como a orquite, epididimite e as neoplasias, embora sejam encontrados, apresentam baixa prevalência em touros de corte (Kennedy et al., 2002).

1.5. Degeneração Testicular

A degeneração testicular é considerada uma das causas mais frequentes de redução da fertilidade dos reprodutores. Comumente, a degeneração testicular está relacionada a fatores que levam a alterações na termorregulação da gônada masculina, embora também possa ser decorrente de problemas nutricionais, obstruções dos túbulos seminíferos, dentre outras.

A origem das alterações degenerativas por estresse térmico no parênquima e interstício testiculares reside na modificação do padrão circulatório arterial e venoso. Com a elevação da temperatura, o mecanismo de contracorrente que permite o resfriamento do sangue arterial é prontamente suprimido, resultando na elevação da temperatura do parênquima e redução no fluxo venoso de retorno (Coulter et al., 1988). Por consequência, há um aumento progressivo na demanda metabólica celular em contraste à diminuição da saturação de oxigênio devido à congestão vascular (Setchell et al., 1971). Isso resulta em hipóxia e variação no padrão morfológico tissular. Esse modelo é exemplificado pela febre, nos processos inflamatórios, e pela varicocele, uma alteração vascular que ocorre no testículo do homem (Zorgniotti et al., 1986).

O clima tropical, que envolve elevadas temperaturas, facilita o surgimento de alterações no epitélio seminífero e, conseqüentemente, redução da qualidade seminal (Gabaldi e Wolf, 2002). A modificação no padrão circulatório arterial e venoso, devido à elevação da temperatura, faz com o mecanismo de contracorrente, que permite o resfriamento do sangue arterial, seja prontamente suprimido, resultando na elevação da temperatura do parênquima e redução no fluxo venoso de retorno (Coulter et al., 1988). Conseqüentemente, há um aumento progressivo na demanda metabólica celular em contraste com a diminuição da saturação de oxigênio, devido à congestão vascular (Setchell et al., 1971). Isso resulta em hipóxia e variação no padrão morfológico tissular.

Nem sempre é possível diagnosticar a degeneração testicular durante o exame clínico. De maneira geral, as patologias que atingem os testículos podem ser congênitas, genéticas ou adquiridas, temporárias (reversíveis) ou permanentes (irreversíveis), uni ou bilaterais, sendo que,

quando unilateral, provavelmente é resultado de um evento local e, quando bilateral, decorre de um problema sistêmico (Foster & Ladds, 2007). A classificação temporal está na dependência direta da causa. Lesões ou distúrbios que afetam diretamente as camadas mais profundas do epitélio seminífero tendem a ser irreversíveis, pois afetam as espermatogônias e, portanto, impedem a reposição continuada das células germinativas (Foster, 2007).

Nos processos degenerativos, macroscopicamente, os testículos apresentam menor volume. Na fase inicial do processo, tornam-se macios, flácidos e a superfície de corte mostra-se pálida. Nos processos crônicos, os testículos tornam-se mais firmes à palpação e frequentemente apresentam focos de calcificação junto ao mediastino (McEntee, 1990). À microscopia, os achados são diversos e geralmente levam à perda considerável do epitélio germinativo, podendo ser focal ou difuso. Há presença de vacuolização nas células germinativa, espessamento da túnica própria e descamação ou desprendimento de nichos de células da linhagem germinativa do epitélio seminífero. Em quadros degenerativos mais intensos, pode ser observada picnose nuclear, fibrose intersticial e presença de células gigantes (Foster & Ladds, 2007). Quantitativamente, a frequência de estágios intermediários e finais da espermatogênese é significativamente inferior em touros inaptos por problemas seminais e com graus variados de degeneração testicular.

De acordo com Rao et al. (1980), o processo degenerativo ocorre em diversos pontos do epitélio seminífero, atingindo diferentes segmentos e pode variar desde ausência de lúmen, hiperplasia de células de Leydig, presença apenas da membrana basal até a completa calcificação epitelial. Como reflexo da degeneração, ocorre a perda qualitativa e quantitativa da produção de células espermáticas pelo epitélio germinativo, prejudicando a capacidade do macho em manter a função reprodutiva (Hoflack et al., 2008).

1.6. Hipoplasia Testicular

Hipoplasia testicular é o subdesenvolvimento congênito das gônadas, caracterizada por baixo número de células germinativas nos túbulos seminíferos. A causa mais aceita é que touros com essa patologia apresentam genes recessivos de penetrância incompleta e expressividade variável (Langerlöf, 1934). Essa condição é semelhante à Síndrome de Klinefelter, reconhecida em humanos. Felinos, bovinos, cães, suínos, equinos e ovinos podem apresentar um mosaico com cromossomos XXY. Nos bovinos, contudo, é reconhecidamente de caráter hereditário (Foster & Ladds, 2007). Em touros de corte, essa patologia pode variar de 1,1 a 15,0%, dependendo da raça e região do Brasil (Ohashi et al., 1988; Goiozo et al., 2003). Clinicamente, há tendência de diminuição do perímetro escrotal, embora essa condição não seja observada em todos os casos. Essas observações, em conjunto com os achados histopatológicos, levaram a classificação dos quadros de hipoplasia testicular em leve,

moderada e intensa. Nos casos leves e moderados, a qualidade seminal é pouco afetada, e pode ser confundida com degeneração testicular temporária (Pimentel, 2001).

Microscopicamente, a hipoplasia pode ser dividida em discreta, intermediária ou total, quando difusas no parênquima testicular, de acordo com o conjunto de alterações encontradas. Pode ser uni ou bilateral, sendo o testículo esquerdo afetado com maior frequência (Ladds, 1985). Nos casos discretos e intermediários, as lesões nos túbulos seminíferos, como perda das células germinativas e vacuolização, são semelhantes às encontradas nos quadros de degeneração testicular. Porém, além das alterações degenerativas, há presença de células de Sertoli e poucos espermátócitos primários nos túbulos. Tipicamente não há espessamento da lâmina basal e fibrose intersticial (Foster & Ladds, 2007). Em casos severos ou acentuados, os túbulos apresentam-se com diâmetro reduzido e delineados por células de Sertoli e, às vezes, pela lâmina basal ou espermatogônias que não evidenciam atividade mitótica (*spermatogenic arrest*). A membrana basal poderá ou não estar espessada e hialinizada com um aumento do tecido conjuntivo peritubular (Nascimento & Santos, 2003).

1.7. Avaliação Histológica Testicular

A análise histopatológica testicular é uma tarefa relativamente difícil devido à complexidade da organização tecidual, assim como os diferentes aspectos citológicos e interativos entre interstício e epitélio germinativo (Russel et al., 1990). De forma geral, a avaliação pode ser dividida em quantitativa e qualitativa. A análise quantitativa envolve aspectos relacionados à multiplicação das células germinativas de acordo com as características dos estágios espermatogênicos, incluindo: **a)** interrupção das divisões a partir das espermatogônias; **b)** degeneração e fagocitose das células germinativas; **c)** retardo divisional durante a meiose (*arrest spermatogenesis*) e **d)** destruição das células germinativas (Russel, et al., 1990). Células degeneradas no epitélio germinativo geralmente são fagocitadas pelas células de Sertoli. Assim, é normal que haja perda nas divisões pós-meiose, reduzindo a frequência de células que atingem a espermiogênese (Amann, 1962). Atualmente, esse mecanismo envolve a apoptose das células germinativas que pode se expressar naturalmente ou em resposta a um fator lesivo (Aitken et al, 2011).

Nos bovinos, a avaliação histopatológica testicular, ou qualitativa, tem se resumido à descrição das lesões quando já estabelecidas nos animais descartados para a reprodução (McEntee, 1990). Assim, relatos sobre alterações específicas encontradas em pequenos grupos de touros tornam-se fontes mais importantes sobre os achados clínico-patológicos associados à infertilidade (Foster & Ladds, 2007). Além disso, estudos dessa natureza geralmente não acompanham os animais por longos períodos, limitando a amplitude das observações em relação à função testicular.

Por outro lado, alguns aspectos anatomopatológicos parecem estar associados à raça e não apenas à inaptidão reprodutiva do touro. Hoflack et al. (2008) observaram em touros da raça Belgian Blue que aproximadamente 93,2% dos túbulos examinados apresentavam, no mínimo, uma alteração de caráter patológico, sendo que destas, 67,8% apresentavam vacuolização nas células germinativas e 48,0% com restos celulares luminiais. Embora essas lesões reflitam alterações compatíveis com baixa qualidade seminal, muitas alterações não indicam uma etiologia definida além de serem reversíveis do ponto de vista funcional.

1.8. Morfometria espermática

A avaliação morfológica do sêmen tem sido considerada como um dos fatores mais importantes para determinar a qualidade espermática e, conseqüentemente, estimar a fertilidade do animal. Contudo, a estimativa subjetiva fornecida por essa forma de avaliação tem se mostrado insuficiente, uma vez que não avalia a estrutura interna do espermatozoide (Beletti et al., 2004).

Caso a qualidade de um ejaculado seja identificada incorretamente, as perdas econômicas afetam tanto as centrais de inseminação artificial (IA), quanto os produtores (Ostermeier et al., 2000). Desta forma, o desenvolvimento de um teste para prever, com precisão, o desempenho do sêmen de um animal tem sido o objetivo de muitos pesquisadores (Sancho et al., 1998).

A análise computacional da morfologia espermática, conhecida como morfometria espermática, feita por meio da captura de imagens dos esfregaços de sêmen e com posterior análise das mesmas em *software* específico para tal, comumente leva em consideração mensurações básicas da cabeça espermática como área, perímetro, base, largura e comprimento (Silva et al., 2008), bem como fatores derivados dessas medidas (Garrett e Baker, 1995).

Embora a morfometria da cabeça espermática e sua influência sobre a fertilidade ainda seja alvo de dúvida, sabe-se que alterações intensas na forma da cabeça do espermatozoide possuem influência semelhante às alterações morfológicas identificadas no espermograma de rotina (Davis et al., 1992; Macleod e Irvine, 1995). Uma vez que a quase totalidade do volume da cabeça do espermatozoide é composta pelo DNA espermático, qualquer anormalidade ligada ao material genético, à cromatina ou à matriz nuclear espermática possivelmente resulta em uma mudança na forma do núcleo espermático. Conseqüentemente, já que determinada organização na cromatina e na matriz nuclear são necessárias para a formação de um zigoto, embrião e/ou desenvolvimento fetal, a avaliação da forma nuclear espermática pode ser útil para prever a fertilidade do macho (Ostermeier et al., 2000).

Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil seminal de touros classificados como aptos e inaptos à reprodução, por meio de exame andrológico (CBRA, 1998), bem como realizar uma análise histológica testicular quantitativa e qualitativa, com a finalidade de avaliar a

espermatogênese desses animais, e estabelecer o perfil morfométrico do núcleo de células espermáticas consideradas normais de touros aptos e de inaptos à reprodução.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J.; FINDLAY, J.K.; HUTT, K.J.; KERR, J.K. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*, v. 141, p. 139–150. 2011.
- AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairly bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. *The American Journal of Anatomy*, v.110, p. 49-78, 1962.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDERMARK, N.L. *The testis*. Academic Press, New York, USA, v.1, p. 433-482, 1970
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology*, v.14, p. 397-406, 1993.
- BAARENDES, W.M.; van der LAAN, R.; GROOTEGOED, J.A. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction*, v.121, p. 31-39, 2001.
- BARTH, A.D.; BOWMAN, P.A.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, v.33, p. 31-39, 1992.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotechnic Histochemistry*, v. 79, p. 17-23, 2004.
- BERNDSTON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *American Journal of Anatomy*, v.140, p. 167-179, 1974.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of Bull spermiogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, v.25, p. 383-391, 1973.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2^a ed. Belo Horizonte, 1998, p.11-13.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Review*, v.52, p. 198-236, 1972.
- COULTER, G.H.; SERENGER, P.L.; BAILEY, D.R.C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.84, p.417-423, 1988.

- DAVIS, R.O.; BAIN, D.E.; SIEMERS, R.J.; THAL, D.M.; ANDREW, J.B.; GRAVANCE, C.G. Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertility and Sterility*, v. 58, p. 763-769, 1992.
- FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction*, v.2, p. 90-127, 1970.
- FERNANDES, C. E; FELICIANO SILVA, A.E.D., AZEVEDO, H., BICUDO, S.D. Effect of the testicular degeneration on the sperm head morphometry in Nelore bulls. In: ICAR 2004 - 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. Porto Seguro, BA. *Anais...* v.1, p.269. 2005.
- FOSTER, R.A.; LADD, P.W. Male Genital System. In.: MAXIE, M.G. Jubb, Kennedy and Palmer's. *Pathology of Domestic Animals*, 5^a ed., 2007, p. 565-619.
- FOSTER, R.A. Male reproductive system. In.: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Pathology Basis Veterinary Disease*, 4^a ed, 2007, p. 1317-1348.
- GABALDI, S.H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. *Ciências Agrárias*, v. 2, p.66-70, 2002.
- GARRETT, C.; BAKER, H. W. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility*, v. 63, p.1306-1317, 1995.
- GOIOZO, P.F.I; LIMA, J.P; DI SANTIS, G. W; BANDARRA, E.P; LIMA, M.C; BALIEIRO, J.C.C; ROSAS FILHO, A. C. Hipoplasia testicular (discreta e moderada) e sua correlação com o perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, p. 559-560, 2003.
- GRAVANCE, C.G., LIU, I.K.M., DAVIS, R.O., HUGHS, J.P., CASEY, P.J. Quantification of normal sperm of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.108, p.41-46, 1996.
- HOFLACK, G., W. VAN DEN BROECK, W., MAES, D., VAN DAMME, K., OPSOMER, G., L. DUCHATEAU, L., DE KRUIF, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. VAN SOOM, A. Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, v. 69, p. 323-332, 2008.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.; EDELWEISS, M.I. Quantificação dos estágios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com e sem alteração na qualidade seminal. *Ciência Rural*, v.33, p. 1111-1115, 2003.

- 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.
- KENNEDY, S.P.; SPITZER, J.C.; HOPKINS, F.M.; HIGDON, H.L.; BRIDGES, W.C. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriogenology*, v.58, p. 974-961, 2002.
- LADDS, P.W. The male genital system. In: JUBB, K.V.F, KENNEDY, P.C. *Pathology of domestic animals*. Academic Press, New York, 3a ed, 1985, p. 471-529.
- LAGERLÖF, N. Morphological studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathologic Microbiological Scandinavian*, v. 19, p. 245-66, 1934.
- MACLEOD, I.C.; IRVINE, D.S. The predictive value of computer-assisted analysis in the context of a donor insemination programme. *Human Reproduction*, v.10, p. 580-586, 1995.
- McENTEE K. *Reproductive pathology of domestic animals*. Academic Press, San Diego, CA, 1990. 401p.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologia da Reprodução de Animais Domésticos. 2^a ed, p. 94-96, 2003.
- OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e mestiços criados em clima amazônico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 2, p. 31-35, 1988.
- OSTERMEIER, G.C.; SARTOR-BERGFELT, R.; SUSKO-PARRISH, J.L.; PARRISH, J.J. Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag. Biotec. Net*, v.2, 2000.
- OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVERSON, D.P.; PARRISH J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*, v.22, p.595-603, 2001.
- PIMENTEL, C.A. Infertilidade no touro. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MÉNDEZ, M. C, LEMOS, R. A.A. *Doenças de ruminantes e equinos*, São Paulo, SP, v.2, p. 382-399, 2001.
- RAO, R A., BANE, A. GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, v. 14, p.1-12, 1980.

- REICHENBACH, H.D.; MORAES, J.C.F.; NEVES, J.P. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GGONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. Roca, 2^a ed, 2008 p. 57-81.
- RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S.; CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International Journal of Andrology*, v.16, p.286, 1990.
- SANCHO, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; TABLADO, L.; de MONSERRAT, J.J.; SOLER, C. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, v. 50, p. 27-37, 1998.
- SETCHELL, B. P.; VOGLMAYR, J. K.; HINKS, N. T. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.24, p. 81-89, 1971.
- SILVA, R.T.; MENDES JÚNIOR, J.O.B.; BELETTI, M.E. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões *in vitro* utilizando touros zebuínos. *Acta Sci. Animal Science.*, v.30, p.473-478, 2008.
- THUNDATHIL, J.; MEYER, R.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, v.54, p. 461-467, 2000.
- WALTERS, A.H.; EYESTONEB, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSONA, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa abnormal morphology. *Theriogenology*, v.63, p.1925-1937, 2005.
- ZORGNIOTTI, A. W.; COHEN, M. S.; SEALFON, A. L. Chronic scrotal hypothermia: results in 90 infertile couples. *Journal of Urology*, v. 135, p.944-947, 1986.

Morfometria do núcleo espermático associada à avaliação histológica testicular em bovinos

Morphometry of the sperm nucleus associated with de histological evaluation of the beef bull

Débora Carvalho Meldau^{1*}; Carlos Eurico dos Santos Fernandes²

Revista Semina: Ciências Agrárias - Universidade Estadual de Londrina

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar a histologia testicular e o perfil morfométrico nuclear espermático em touros de corte diagnosticados como aptos (n=7) e inaptos (n=7) quanto ao potencial reprodutivo. Esfregaços corados pelo método citológico rápido foram usados para mensurações nucleares diretas (base (μm), largura (μm), comprimento (μm), perímetro (μm) e área (μm^2)) e indiretas (índice de circularidade (0-1), índice de alongamento (0-1)), de 50 células espermáticas. Fragmentos testiculares obtidos pós orquiectomia foram usados para análise histológica. Segmentos tubulares (n=100/touro) foram classificados de acordo com integridade tubular, disposição das células germinativas, presença de alterações descamativas e necrose intratubular. O percentual de túbulos contendo espermátides alongadas e/ou espermatozoides foi usado como indicador meiótico. Touros aptos apresentaram maior frequência de integridade tubular (38,2%) e índice meiótico (29,4%) em relação aos inaptos (8,8% e 6,6%, respectivamente). O comprimento, circularidade, largura e base foram as variáveis de melhor explicaram a variação da área nuclear espermática ($R^2=0,80$, $p<0,01$) nos touros aptos. Para os inaptos, o comprimento, a circularidade e a base foram as mais significativas ($R^2=0,67$, $p<0,01$). Concluiu-se que touros com cerca de 30,0% de segmentos tubulares comprometidos estruturalmente, podem ser considerados subférteis e, portanto, inaptos à reprodução. Nesses indivíduos além das alterações histológicas há maior proporção de defeitos de cabeça e formação de maior heterogeneidade na área do núcleo espermático, sugestivo de imaturidade na condensação da cromatina.

Palavras-chave: Morfometria espermática, avaliação histológica, sêmen, bovinos.

Abstract

The aim of this study was to analyze the testicular histology and morphometric profile of sperm nucleus from beef bulls classified according its reproductive condition in satisfactory (n = 7) and unsatisfactory (n = 7). Sperm smears were stained by Diff-Quick for the nuclear measurements. It was analysed direct (base (μm), width (μm), length (μm), perimeter (μm), area (μm^2)) and indirect (index circularity (0-1), index of elongation (0-1)) nuclear measurements from 50 sperm cells. Testicular fragments obtained after orchietomy were used for histological analysis. Tubular segments (n = 100/bull) were classified according

¹ Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil. deborameldau@yahoo.com.br

² Departamento de Patologia, Centro de Ciência Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil. carlos.fernandes@ufms.br

* Autor para correspondência

tubular integrity, germ cells arrangement, presence of abnormal desquamation and intratubular necrosis. The percentage of tubules containing elongated spermatids and/or spermatozoa was used as an meiosis indicator. Satisfactory bulls had a higher frequency of tubular integrity (38.2%) and meiotic index (29.4%) compared to unsatisfactory ones (8.8% and 6.6%, respectively). Length, roundness, width and base were the variables that best explained the variation in sperm nuclear area ($R^2 = 0.80$, $p < 0.01$) in satisfactory bulls. For the unsatisfactory ones, length, roundness and base were the most significant measurements ($R^2 = 0.67$, $p < 0.01$). We concluded that bulls with about 30.0% of structurally compromised tubular segments can be considered subfertile and thus unsatisfactory to reproduce. These individuals apart from histological changes there is more proportion of defects in head formation and more heterogeneity in the area of sperm nucleus, indicative of immaturity in chromatin condensation.

Keywords: Sperm morphology, histologic evaluation, semen, bovine.

Introdução

Diversas alterações clínico-patológicas observadas no sistema reprodutivo de touros geralmente estão associadas à redução da fertilidade de forma temporária ou definitiva (VALE-FILHO; PINHEIRO; BASUR, 1996). O impacto maior dessas alterações incide sobre a função testicular, afetando diretamente a espermatogênese e, portanto, modificando os padrões seminais (PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUITIÉRREZ-ADÁN, 2008).

O processo degenerativo testicular é um dos principais fatores que levam a uma maior taxa de anormalidades espermáticas e, conseqüentemente, diminuição da fertilidade em mamíferos. Embora tenha havido avanços nos modelos propostos para melhorar a eficiência dos sistemas produtivos, as taxas de descarte de reprodutores pela baixa qualidade seminal ainda são preocupantes. No Mato Grosso do Sul, esses índices variaram entre 15 a 25% (NOGUEIRA et al., 2011) em touros Nelore. Recentemente, Fernandes et al. (2010) observaram 18,6% de descarte em touros com, no mínimo, uma alteração no sistema reprodutivo associada à baixa qualidade seminal. Os resultados mostraram ainda que 89,0% dos touros inaptos apresentavam processo degenerativo testicular, sendo que destes, 41,4% e 35,7% apresentavam grau leve ou moderado, respectivamente, mantendo características seminais insatisfatórias. Além disso, 7,0% dos touros apresentaram evidências histológicas de hipoplasia gonadal.

O espermograma é uma das principais formas para se estimar a fertilidade do macho na rotina veterinária. As diferentes características espermáticas avaliadas no espermograma englobam motilidade, vigor, turbilhonamento e morfologia das células espermáticas. Essas análises podem ser insuficientes, já que não avaliam a estrutura da cromatina, que pode indicar mais adequadamente o status funcional do gameta masculino, habilidade de fecundação e desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2004).

Por outro lado, novas técnicas semiológicas, especialmente de baixo custo, devem ser estudadas e/ou incorporadas à rotina de seleção e avaliação andrológica, buscando identificar mais acuradamente subpopulações de indivíduos potencialmente subférteis.

A análise de importantes defeitos, como os de cabeça e núcleo espermático, na avaliação do sêmen bovino, ainda é baseada na microscopia visual. Embora seja rápida e útil para o diagnóstico, é passível de

erros por não permitir a identificação e quantificação de pequenas variações entre subpopulações espermáticas. Ambos os defeitos são os mais importantes para o diagnóstico e prognóstico das alterações reprodutivas no touro, porém sua relação nem sempre pode ser estimada em termos de fertilidade.

Nesse contexto, diferentes defeitos morfológicos na estrutura nuclear, contorno, forma da cabeça espermática e compactação da cromatina, têm sido empregados com o objetivo de identificar diferenças entre indivíduos e seu impacto sobre a fertilidade (OSTERMEIER et al., 2001). Desta forma, a morfometria digital tem obtido resultados promissores com relação à estimativa de diferentes medidas em planimetria do núcleo espermático e relação com anormalidades na cromatina (SAILER; JOST; EVERSON, 1996).

O objetivo deste trabalho foi realizar análise histológica testicular quantitativa e qualitativa, com a finalidade de avaliar a espermatogênese desses animais, e estabelecer o perfil morfométrico do núcleo de células espermáticas consideradas normais de touros aptos e inaptos à reprodução.

Material e Métodos

Animais

Foram usados 14 touros, das raças Nelore (n=3) e Brangus (n=11) com idade entre 2 a 4 anos, com ou sem histórico reprodutivo conhecido, que não apresentavam alterações clínicas no aparelho reprodutivo, pertencentes a propriedades particulares localizadas próximas ao município de Campo Grande, MS (20° 26' 34" S, 54° 38' 45" W).

Exame andrológico

Os animais foram submetidos a exame andrológico conforme normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Brevemente, após exame clínico completo e especial, os touros foram submetidos à coleta de sêmen por eletroejaculação. Volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade e vigor foram avaliados imediatamente após a colheita em microscopia de campo claro. Em seguida, foram preservadas amostras de sêmen em formol-salina tamponada 1% para exame morfológico realizado em microscopia de contraste de fase em 1000x (Olympus BX45). Para a análise morfométrica, foram obtidos esfregaços seminais, que foram corados pelo método citológico rápido (solução contendo 0,1% de triarilmetano, xanteno e tiazina).

Após os exames clínicos e de sêmen, os touros foram classificados em aptos (n=7) quando apresentam, no mínimo, 70% de motilidade, vigor 3, turbilhonamento 3, e inaptos (n=7) quando não atingiram esses valores.

Análise Morfométrica do Núcleo Espermático

As análises morfométricas dos núcleos espermáticos de células sem defeitos morfológicos foram feitas após captação de imagens (2048x1536 *pixels*), em microscopia de campo claro, em aumento de 40x, pelo sistema Moticam 2300 (resolução xy), realizando-se as mensurações no *software* Motic Images 2.0. Foram utilizadas 50 cabeça de células espermáticas observadas em apenas um esfregaço de sêmen, coradas pelo método citológico rápido (solução contendo 0,1% de triarilmetano, xanteno e tizina), para mensuração linear direta do comprimento (μm), largura superior (μm), base (μm), perímetro (μm) e área (μm^2) e indireta

do alongamento ($Alg = (\text{comprimento} - \text{largura}) / (\text{largura} + \text{comprimento})$) (0-1) e circularidade ($Circ = 4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$) (0-1), segundo Bustos-Obregón (2002).

Análise Histológica Qualitativa e Quantitativa

Para a avaliação histológica, os animais foram submetidos à orquiectomia unilateral (testículo direito). Fragmentos da região média testicular de 2cm² foram selecionados ao acaso e fixados em solução de Bouin por 24h e, posteriormente, foram realizadas três lavagens subsequentes em álcool 70°GL e, subsequentemente, embebidos e armazenados em álcool 70°GL. Os fragmentos de testículo foram desidratados em álcool (70, 80, 95, 95 e 100°GL, em ordem crescente) emblocados em parafina histológica, cortados com 4µm de espessura e lâminas histológicas foram fabricadas. Por conseguinte, foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

A análise histológica qualitativa foi baseada na organização e arquitetura do tecido tubular, sendo consideradas túnica própria, células de Sertoli, todas as células da linhagem germinativa, bem como a presença de alterações nucleares e citoplasmáticas nessas células. Em microscopia de campo claro (200x) foram avaliados 100 segmentos de túbulos seminíferos de cada animal, selecionados aleatoriamente e classificados em A, B, C e D, como segue: A, segmento tubular normal com contorno simétrico e todas as linhagens de células germinativas presas ao epitélio seminífero; B, segmento apresentando desprendimento ou destacamento de nichos de células germinativas, além de discreta vacuolização dessas células, preservando-se o contorno tubular; C, segmento com desorganização do epitélio germinativo e do contorno tubular, apresentando perda significativa ou ausência de células germinativas, intensa vacuolização das células germinativas, picnose, necrose e, eventualmente, presença de células gigantes, além de espessamento da túnica própria; D, segmentos com diâmetro reduzido, ausência de espermatogênese evidenciando somente a túnica própria espessada, prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e, ocasionalmente, espermatogônias sem atividade mitótica.

Com base no modelo proposto por Bergmann e Kliesch (2010), para a análise quantitativa, foram estimados em 100 segmentos de túbulos seminíferos escolhidos aleatoriamente, aqueles que apresentavam espermátides alongadas e/ou espermatozoides em seu lúmen.

Análise Estatística

As características seminais foram comparadas entre as condições reprodutivas pelo teste de Mann-Whitney U para amostras independentes. A análise de variância, modelo linear univariado, foi usada para estimar o efeito da condição reprodutiva sobre a classificação histológica e índice espermiogênico observada por touro. O efeito da condição reprodutiva para as variáveis morfométricas foi estimado pela análise de variância, modelo linear univariado, ajustando-se por o efeito de touro (covariável). A análise de regressão linear múltipla (método *stepwise*) foi usada para estimar o conjunto de variáveis morfométricas (independentes) que melhor explica a variação da área (dependente) do núcleo espermático em cada condição reprodutiva.

Resultados

A tabela 1 mostra o efeito da condição reprodutiva para motilidade, vigor, turbilhonamento e espermatozoides normais e com defeitos de cabeça. Touros inaptos apresentaram frequências inferiores de segmentos tubulares classificados como A e índice espermiogênico (IE), e superiores nos segmentos classificados como C e D (Figura 2). Características específicas observadas entre as classificações adotadas estão representadas na Figura 1.

A análise de variância, modelo univariado, realizada com as variáveis morfométricas, evidenciou diferença altamente significativa ($P < 0,01$) de quase todas as variáveis entre as categorias reprodutivas, exceto da variável comprimento (Tabela 2).

Pela análise de regressão múltipla foram obtidos quatro modelos distintos, o de maior sensibilidade foi baseado nas variáveis comprimento, largura, base e circularidade ($R^2=0,80$) para os aptos, enquanto que o modelo de maior sensibilidade para os inaptos foi o baseado nas variáveis comprimento, circularidade e base ($R^2=0,67$) (Tabela 3). A Figura 3 mostra a representação do valor residual da área do núcleo espermático de bovinos resultante dos modelos de regressão múltipla e o valor residual predito, de acordo com a condição reprodutiva.

Discussão

Alterações na estrutura e organização do epitélio seminífero são reconhecidamente importantes quanto a redução da fertilidade em bovinos. Diversos fatores afetam diretamente a função testicular, de forma contínua ou temporária, refletindo diretamente na qualidade seminal. Neste contexto, os critérios adotados para avaliação dos touros, por ocasião do exame andrológico, têm sido unânimes quanto ao estabelecimento de padrões a serem adotados, tendo em vista o diagnóstico do potencial reprodutivo. No presente estudo, a classificação original do grupo inaptos restringiu-se ao exame andrológico clássico, considerando aspectos semiológicos, de colheita e interpretação dos achados seminais (Tabela 1). Contudo, procurou-se incluir indivíduos sem alterações patológicas clinicamente detectáveis, a fim de identificar possíveis fatores intrínsecos na arquitetura do epitélio seminífero que poderiam explicar variações no perfil morfométrico nuclear espermático.

A análise histológica dos segmentos do epitélio germinativo revelou que tanto animais aptos quanto inaptos apresentam alterações de ordem estrutural, especialmente aquelas classificadas como B (Figura 2). Neste caso, o desprendimento ou descamação de pequenos nichos de células germinativas, resguardando a simetria e compactação dos demais elementos tubulares, foi observado em aproximadamente metade dos segmentos avaliados, sem, no entanto, significar profundas alterações de ordem funcional. Da mesma forma, Hoflack et al. (2008) também não observaram diferença significativa entre touros classificados distintamente com relação à qualidade seminal, com os touros com baixa e alta qualidade seminal apresentando, respectivamente, cerca de 90% e 70% de segmentos tubulares evidenciando alterações histológicas condizentes com o início de um processo degenerativo testicular, sem representar significativo prejuízo à espermatogênese. Por outro lado, a diferença encontrada na frequência de segmentos considerados normais

(A), com alterações histológicas (C) e hipoplásicos (D) nos touros inaptos (Figura 2), está de acordo com a expressiva redução no índice espermiogênico (IE). É importante ressaltar que os segmentos tubulares do tipo D são considerados hipoplásicos por apresentarem interrupção no processo de diferenciação das células germinativas (*spermatogenic arrest*), com consequente diminuição ou ausência da produção de espermatozoides (MARTIN-DU PAN; CAMPANA, 1993), condição sugerida pelo resultado. Com base na diferença entre os estágios finais do epitélio seminífero, Horn et al. (2003) verificaram redução entre 3 a 7% em touros inaptos, sem considerar possíveis alterações de caráter estrutural. No presente estudo, a diferença estimada para o índice espermiogênico (IE) entre as condições reprodutivas foi de aproximadamente 23,0% (IE, Figura 2), indicando que a redução das linhagens pós-meióticas está associada a prejuízos na organização histológica do epitélio germinativo (KRISHNALINGAM et al., 1982; SETTERGREN; MCENTEE, 1992).

Diversos estudos têm mostrado que graus diferenciados de alterações testiculares afetam a formação e o remodelamento do núcleo espermático nos bovinos, alterando substancialmente o seu formato (STEFFEN, 1997; Van CAMP, 1997; CHENOWETH, 2005; COOPER; YEUNG, 2006). As modificações dos padrões nucleares envolvem desde a compactação da cromatina até a maturação final nuclear, finalizada no ambiente epididimal (HERMO; OKO; MORALES, 1994; CABALLERO; FRENETTE; SULLIVAN, 2011). É natural, contudo, que touros mantidos em condições extensivas, apresentem variações na forma e morfometria do núcleo espermático, por estarem sujeitos a diversos fatores extrínsecos, como, por exemplo, má nutrição, traumas e variação da temperatura ambiental, que afetam direta ou indiretamente a espermatogênese. Tais variações são esperadas entre indivíduos mesmo que estes apresentem fertilidade comprovada (OSTERMEIER et al., 2001; BELETTI et al., 2005). Além disso, os métodos de fixação celular, calibração das imagens digitais, equipamentos e métodos de mensuração podem alterar a conformação ou os valores absolutos das medidas. Neste estudo, as medidas foram realizadas em esfregaços corados instantaneamente sob microscopia de campo claro, a partir da padronização das imagens quanto ao total de pixels, estando de acordo com outros estudos e metodologias (BOERSMA; BRAUN; STOLLA, 1999; FOOT, 2003). Embora o método empregado seja simples quanto a obtenção das medidas lineares (comprimento, largura e base), área e perímetro, variações nas imagens podem restringir a definição dos campos a serem mensurados (JAGOE; WASHBROOK; HUDSON, 1986; BOERSMA; BRAUN; STOLLA, 1999; MICKLEM; SANDERSON, 2001). Este é um aspecto intrínseco à análise computadorizada do formato e tamanho dos núcleos espermáticos, podendo superestimar ou subestimar o erro entre indivíduos, entre grupos experimentais e entre as medidas obtidas por núcleo. De acordo com Perez-Sanches et al. (1994), amostras com número elevado de núcleos estreitos ou curtos poderiam indicar normalidade no conjunto das medidas, embora morfologicamente sejam anormais. Portanto, a metodologia utilizada neste estudo pode ser vantajosa sobre o sistema totalmente computadorizado, uma vez que os núcleos espermáticos são previamente analisados morfologicamente, rejeitando-se aqueles considerados anormais. Sendo assim, núcleos considerados homogêneos expressariam medidas mais confiáveis, mesmo que o percentual de núcleos anormais tenha sido significativamente diferente entre aptos e inaptos (Tabela 1). Portanto, é

possível inferir que núcleos espermáticos classificados como normais, na avaliação visual, poderiam reter modificações sutis sem que sejam identificadas (GAGE, 1998; OSTERMEIER et al., 2001).

A análise inicial empregada para comparação das medidas morfométricas nucleares revelou que apenas o comprimento não foi diferente ($P=0,223$) entre as condições reprodutivas (Tabela 2). Porém, considerando a área como a medida que melhor representa o núcleo e por ser função das demais medidas, utilizou-se a análise de regressão múltipla (modelo *stepwise*) para estimar o melhor conjunto de variáveis diretas (comprimento, largura e base) e indiretas (circularidade e alongamento) associados à variação da área para cada condição reprodutiva (Tabela 3). Além da diferença nos coeficientes de determinação, a largura foi a única medida excluída do modelo estimado para os touros inaptos, sugerindo que esta não foi importante para a variação da área. Entretanto, a estimativa do índice de circularidade foi aproximadamente 43,0% superior neste grupo (diferença proporcional estimada para a constante B), demonstrando que a área nuclear foi mais arredondada ou circular em relação a área dos touros aptos. Assim, a análise do conjunto das variáveis associadas à área nuclear indica que nos animais aptos os núcleos tendem a ser mais alongados, mais estreitos (CASEY et al., 1996; OSTERMEIER et al., 2001) e com maior homogeneidade. Ao contrário, nos inaptos, os núcleos tendem a ser mais esféricos ou menos alongados (Tabela 3). Esses resultados comprovam a hipótese de que os touros inaptos, por apresentarem maiores alterações nos túbulos seminíferos e menor eficiência na espermatogênese, apresentam núcleos espermáticos mais heterogêneos (Figura 3) com tendência a serem mais arredondados. Esse formato nuclear pode ser representativo de estruturas imaturas com redução na condensação da cromatina (SAILER et al., 1996; VIEYTES; CISALE; FERRARI, 2008).

Com base na insulação escrotal, um modelo clássico para o estudo da espermatogênese, mudanças na histologia testicular e na morfometria do núcleo espermático têm sido reportadas. Em touros insulados durante uma semana, Devkota et al. (2010) encontraram lesões degenerativas, caracterizadas por núcleos picnóticos, vacuolização de células germinativas e perda descamativa do epitélio tubular. A presença de segmentos tubulares imaturos, com marcação positiva para α -SMA (α -smooth muscle actin) e vimentina demonstra que este modelo se assemelha a touros com processos degenerativos avançados, com possíveis alterações na estrutura espermática. Tais alterações são semelhantes às encontradas no grupo de touros inaptos e sugerem, portanto, que mecanismos envolvendo a relação entre as células de Sertoli, o desenvolvimento e a maturação das células germinativas sejam críticos para heterogeneidade dos núcleos espermáticos obtidos durante o exame de sêmen. O surgimento de anormalidades espermáticas segue uma ordem cronológica depois de ocorrido um insulto escrotal, sendo que o tipo de defeitos relaciona-se com a fase da espermiogênese na qual estas células encontravam-se no momento do insulto (VOGLER et al., 1993). Mudanças no formato da cabeça espermática ocorrem entre 14 e 42 dias pós-insulação com redução na protaminação nuclear, um indicador da fragilidade do DNA (SETCHEL, 1998; RAHMAN et al., 2011). Similarmente, touros com reduzida fertilidade e com maiores percentuais de anormalidades seminais, apresentam formas nucleares menos homogêneas com altos índices de cromatina anormal (DOBRINSKI et al., 1994).

Conclusão

Em conclusão, touros com 32,4% de segmentos dos túbulos seminíferos comprometidos estruturalmente, incluindo reduzida multiplicação pós-meiótica das linhagens germinativas, podem ser considerados subférteis e, portanto, inaptos à reprodução. Nesses indivíduos além das alterações histológicas há maior frequência de defeitos de cabeça e formação de maior heterogeneidade na área do núcleo espermático, sugestivo de imaturidade na condensação da cromatina.

Referências

- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotechnic e Histochemistry*, v.79, p.17-23, 2004.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparasion of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brasil. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.105-116, 2005.
- BERGMANN M.; KLIESCH S. Testicular Biopsy and Histology. In: NIESCHLAG, E.; BEHRE, H.M.; NIESCHLAG, S. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*, 3^a ed., p. 155-167, 2010.
- BOERSMA, A.A; BRAUN, J.; STOLLA, R. Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, v.34, p. 77-82, 1999.
- BUSTOS-OBREGÓN E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*, v.57, p.1207-1218, 2002.
- CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturation changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary Medicine International*, v.2011, p.1-13, 2011.
- CASEY, P.J.; GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O.; CHABOT, D.D.; LIU, I.K.M. Mophometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, v.45, p.575-582, 1997.
- CHENOWETH, P. Genetics sperm defects. *Theriogenology*, v.64, p.457-468, 2005.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2º Ed. Belo Horizonte:CBRA, 1998.
- COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. Sperm maturation in the human epididymis. In: THE SPERM CELL. PRODUCTION, MATURATION, FERTILIZATION, REGENERATION. Cambridge University Press. Cambridge, UK, p. 72-107, 2006.
- DEVKOTA, B.; SASAKI, M.; MATSUI, M.; TAKAHASHI, K.; MATSUZAKI S.; KOSEKI T.; MIYAKE Y. Effects of scrotal insulation and pathological lesions on –Smooth Muscle actin (SMA) and vimentin in the bull testes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, p. 187–190, 2010.

- DOBRINSKI, I.; HUGHES, H. P.; BARTH, A. D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p. 531-538, 1994.
- FERNANDES, C.E.; ZART, A.L.; MESQUITA, K. Alterações clínico-genitais e histopatologia testicular em touros de corte no Mato Grosso do Sul. In: VI ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO (ENDIVET), 2010, Campo Grande, MS. *Anais...* Interbio, v.4, n.1, p. 87, 2010a.
- FOOT, R. Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. *Theriogenology*, v.59, p. 1765-1773, 2003.
- GAGE, M.J.G. Mammalian sperm morphometry. *Proceedings of the Royal Society London*, v. 265, p. 97-103, 1998.
- HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C.R. Secretion and encodytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *International Review of Cytology*, v.154, p. 105-189, 1994.
- HOFLACK, G.; VAN DEN BROECK, W.; MAES, D.; VAN DAMME, K.; OPSOMER, G.; DUCHATEAU, L.; DE KRUIF, A.; RODRIGUEZ-M ARTINEZ, H.; VAN SOOM, A. Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, v.69, p. 323-332, 2008.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.; EDELWEISS, M.I. Quantificação dos estágios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com e sem alteração na qualidade seminal. *Ciência Rural*, v.33, p. 1111-1115, 2003.
- JAGOE, J.R.; WASHBROOK, N.P.; HUDSON, E.A. Morphometry of spermatozoa using semiautomatic images analisys. *Journal of Clinical Pathology*, v.39, p. 1347-1352, 1986.
- KRISHNALINGAM, V.; LADDS, P.W.; ENTWISTLE, K.W.; HOLROYD, R.G. Quantitative macroscopic and histological study of testicular hypoplasia in *Bos indicus* strain bulls. *Reserch Veterinary Science*, v.32, p.131-139, 1982.
- MARTIN-DU PAN, R.C.; CAMPANA, A. Physiopathology of spermatogenic arrest. *Fertility and Sterility*, v.60, p. 937-946, 1993.
- MICKLEM, K.; SANDERSON, J. Digital imaging in patology. *Current Diagnostic Patology*, v. 7, p. 131-140, 2001).
- MOURA, A.A.; ERICKSON, B.H. Testicular development, hormone profiles and histology of the yearling seminiferous tubules and interstitium of Angus bulls with Sertoli-cell only syndrome and spermatogenic arrest at the level of A1 spermatogonia and primary spermatocytes. *Theriogenology*, v.55, p. 1469-148, 2001.
- NOGUEIRA, E.; COSTA E SILVA, E.; FERNANDES, C.E.; SILVA, A.S.; BORGES, J.C. perfil andrológico de touros Nelore criados extensivamente no planalto e no pantanal sul-matogrossense. In: Circular Técnica Embrapa, 2011.

- OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVERSON, D.P.; PARRISH J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*, v22, p.595-603, 2001.
- PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*, v.75, p.40-47, 2008.
- PEREZ-SANCHES, F.; de MONSERRAT, J.J.; SOLER, C. Morphometric analysis of human sperm morphology. *International Journal of Andrology*, v.17, p. 248-255, 1994.
- RAHMAN, M.B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J.J.; SOOM, A.V. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, v.76, p. 1246-1257, 2011.
- SAILER, B.L.; JOST, L.K; EVERSON P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, v.24, p.167–173, 1996.
- SETCHELL, B.P. Heat and the testis. *Journal Reproduction and Fertility*, v.114, p. 179-194, 1998.
- STEFFEN, D. Genetic causes of bull infertility. *Veterinary Clinics of North America*, v.13, p. 243-253, 1997.
- STTERGREN, I.; McENTEE, K. Germ cell weakness as a cause of testicular hypoplasia in bulls. *Acta Vet Scand*, v.33, p. 273-82, 1992.
- VALE-FILHO, V.R.; PINHEIRO, L.E.L.; BASUR, P.K. Reproduction in Zebu Cattle. In: Morrow, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*, 2^a ed. Philadelphia Saunders, p.437-442, 1996.
- VAN CAMP, S.D. Common causes of infertility in the bull. *Veterinary Clinics of North America*, v.13, p. 203-230, 1997.
- VIEYTES, A.L.; CISALE, H.O.; FERRARI, M.R. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. *Veterinary Record*, v.163, p. 625-629, 2008.
- VOGLER, C.J.; BAME, J.H.; DE JARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, M.L.; SAACKE, R.G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology*, v.40, p.1207–1219, 1993.

Figura 1. Aspectos histológicos de segmentos transversais tubulares em bovinos. (a) e (b) Segmentos tubulares classificados como A, sem alterações histológicas significativas; (a) HE, 110x, (b), HE, 200x. (c) Segmento tubular classificado como B; epitélio seminífero destacado com células germinativas aglomeradas no lúmen e presença de discreta vacuolização nas células do epitélio seminífero ainda preservado (HE, 100x). (d) Segmento tubular classificado como C; nota-se ausência total de células germinativas, intensa presença de vacuolização, discreto espessamento da túnica própria; há perda acentuada do contorno tubular (HE, 100x). (e) Segmento tubular classificado como D; ausência de linhagens de células germinativas com proeminência citoplasmática das células de Sertoli, caracterizando quadro de hipoplasia tubular; discreto espessamento da túnica própria (HE, 400x). (f) segmento tubular representando o final da espermiogênese com espermatozoides próximos à espermição (HE, 400x).

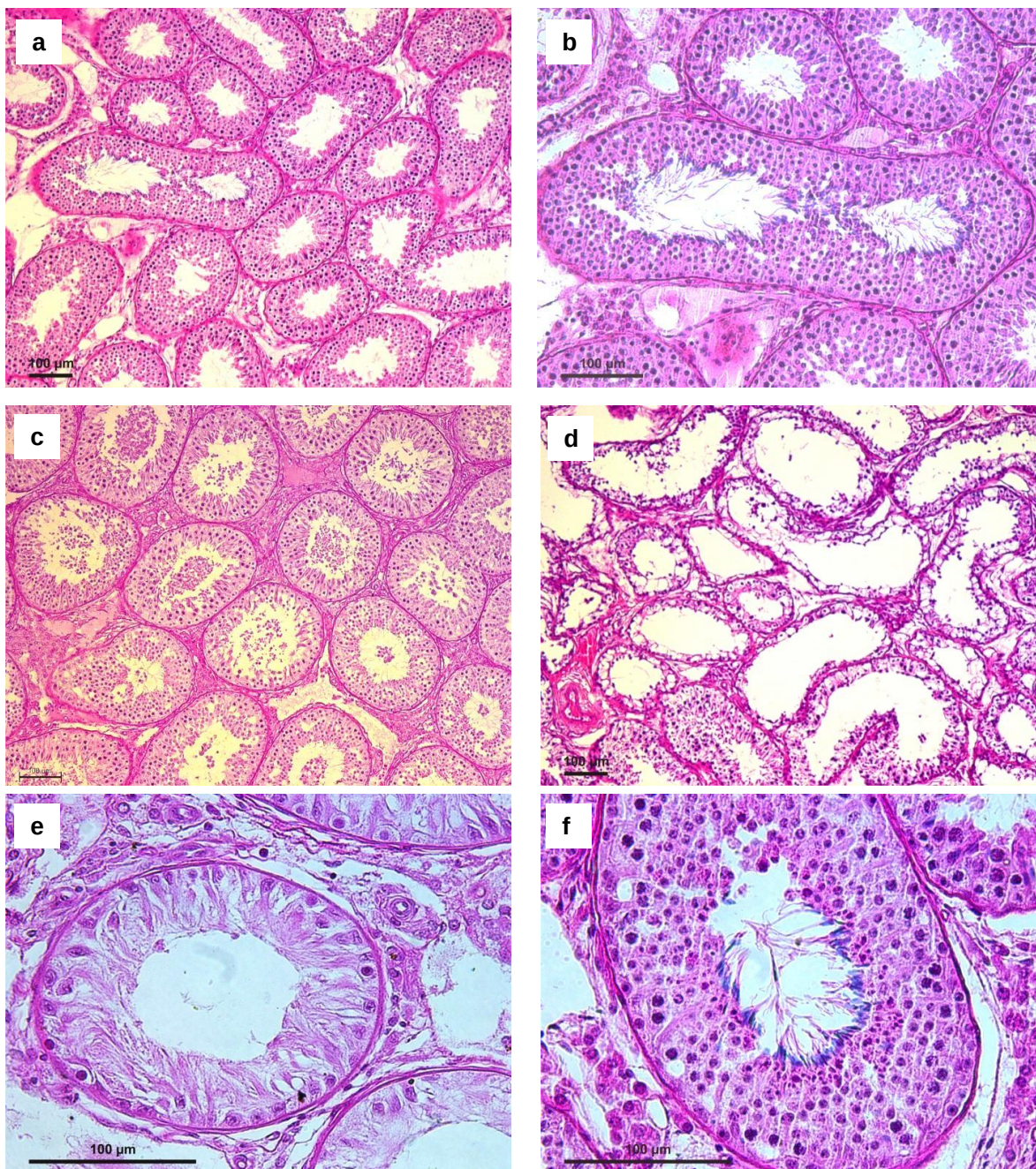


Figura 2. Média e erro padrão das frequências dos segmentos de túbulos seminíferos de bovinos classificados de acordo com as características histológicas qualitativas e quantitativas, com base na condição reprodutiva. A, normal; B, descamado; C, desorganizado; D, hipoplásico. Classificação quantitativa feita por meio do índice de espermiogênese (IE). Letras distintas entre colunas representam diferença ($P < 0,05$) entre as classificações reprodutivas.

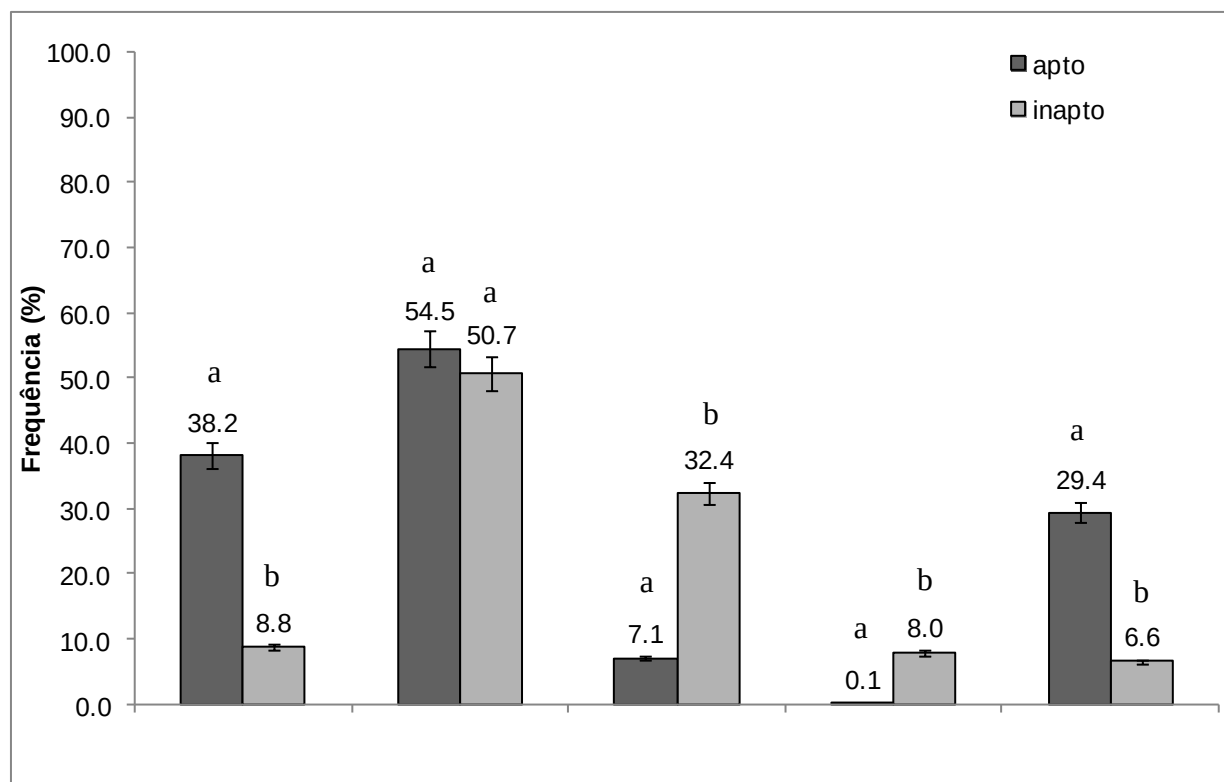


Tabela 1. Média, erro padrão da média (epm) e intervalo de confiança (IC) das características seminais de bovinos de acordo com a condição reprodutiva.

Características seminais	Aptos (n=7)		Inaptos (n=7)		P*
	Média epm	(IC 95%)	Média epm	(IC 95%)	
Motilidade	60,00 ±5,34	(46,92-73,07)	34,28 ±7,51	(15,90-52,67)	0,026
Vigor	3,29 ±0,29	(2,59-3,98)	2,00 ±0,31	(1,24-2,76)	0,017
Normal	84,86 ±2,38	(79,04-90,67)	44,00 ±8,82	(22,41-65,59)	0,002
Defeitos de cabeça	4,57 ±1,29	(1,42-7,72)	21,43 ±9,16	(-0,98-43,84)	0,011

epm=erro padrão da média

Tabela 2. Média ajustadas, erro padrão da média (epm) e intervalo de confiança (IC) para variáveis morfométricas de bovinos de acordo com a condição reprodutiva.

Condição Reprodutiva					
	Aptos (n=7)		Inaptos (n=7)		
Variáveis Morfométricas	Média epm	(IC 95%)	Média epm	(IC 95%)	P*
Área (µm ²)	31,95 ±0,37	(31,23-32,67)	35,22 ±0,36	(34,50-35,94)	0,001
Perímetro (µm)	22,46±0,12	(22,23-22,70)	23,17 ±0,12	(22,93-23,40)	0,001
Base (µm)	2,17 ±0,04	(2,09-2,24)	2,62 ±0,04	(2,54-2,69)	0,001
Largura (µm)	4,43 ±0,04	(4,35-4,50)	4,73 ±0,04	(4,65-4,80)	0,001
Comprimento (µm)	8,63 ±0,51	(8,53-8,72)	8,51 ±0,51	(8,41-8,61)	0,223
Circularidade (0-1)	0,79 ±0,00	(0,79-0,80)	0,82 ±0,00	(0,82-0,83)	0,001
Alongamento (0-1)	0,32 ±0,00	(0,31-0,33)	0,28 ±0,00	(0,28-0,30)	0,001

*considerando o efeito de touro (covariância)

Tabela 3. Modelos de regressão linear múltipla (método *stepwise*), associados à área do núcleo espermático em bovinos, de acordo com a condição reprodutiva.

Condição reprodutiva	Modelo	B	EP	Beta	R ² *
Aptos	Constante	-61,14	3,98		
	Comprimento (μm)	5,22	0,23	0,61	
	Largura (μm)	3,42	0,35	0,30	0,80
	Base (μm)	2,66	0,28	0,25	
	Circularidade (0-1)	34,68	4,63	0,24	
Inaptos	Constante	-64,53	3,99		
	Comprimento (μm)	5,40	0,23	0,79	
	Circularidade (0-1)	60,75	3,72	0,55	0,67
	Base (μm)	1,13	0,25	0,14	

*coeficiente de determinação ajustado

Figura 3. Representação do valor residual da área do núcleo espermático resultante dos modelos de regressão múltipla observada e valor residual predito de acordo com a condição reprodutiva em bovinos

