

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

**PERFIL LEUCOCITÁRIO SEMINAL EM TOUROS DE  
CORTE**

**Adriane Lermen Zart**

CAMPO GRANDE, MS  
2013

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

**PERFIL LEUCOCITÁRIO SEMINAL EM TOUROS DE  
CORTE**

*Seminal leukocitary profile in beef bulls*

**Adriane Lermen Zart**

**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

**ADRIANE LERMEN ZART**

**“PERFIL LEUCOCITÁRIO SEMINAL EM TOUROS DE CORTE”**

“Seminal leukocitary profile in beef bulls”

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

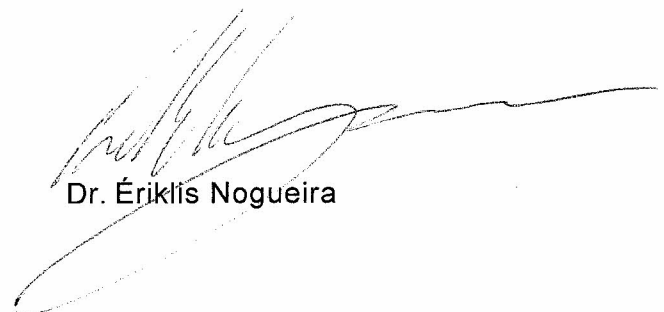
APROVADA: 08/03/2013



Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes  
Orientador



Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva



Dr. Ériklis Nogueira

Aos meus pais, Mônica e Rogério,  
meus exemplos de vida e caráter.

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus sinceros agradecimentos ao Dr. Carlos Eurico Fernandes, muito mais que um orientador, um amigo e um exemplo de pessoa e de profissional.

À toda equipe do laboratório de Patologia Geral do CCBS/UFMS pelo companheirismo, auxílio mútuo e amizade que construímos.

Ao médico veterinário Vicente Coelho Lima e Jurgielewicz pela ajuda no trabalho de campo, fundamental para realização desse trabalho e principalmente pelo apoio, incentivo e paciência durante essa jornada.

Às empresas CRV Lagoa, Androgen e Progen que gentilmente cederam seus animais e instalações para as coletas e análises de sêmen.

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

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pela bolsa de mestrado (Edital 023/2010).

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que tudo mundo vê.”*

*Arthur Schopenhauer*

## Resumo

ZART. A.L. Perfil leucocitário seminal em touros de corte. 2013. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

As células leucocitárias são comumente encontradas no ejaculado de touros, porém o seu papel no plasma seminal ainda não é bem definido. Existem evidências de que a presença de leucócitos no sêmen afete a qualidade do ejaculado, porém, faltam valores de referência para frequência e concentração dessas células na espécie bovina. Diante disso, esse estudo teve como objetivo estabelecer o padrão de concentração e o perfil leucocitário de touros de corte, associando-os à qualidade seminal. Em uma primeira etapa, 57 touros de centrais de coleta e processamento de sêmen foram avaliados para se obter o padrão leucocitário da espécie. Posteriormente, 382 touros criados de forma extensiva foram submetidos ao exame andrológico, classificados quanto à aptidão reprodutiva e tiveram o perfil leucocitário seminal estimado. A concentração média de células leucocitárias na espécie bovina foi de  $4,73 \times 10^6$ /mL de sêmen. Touros inaptos apresentaram uma média de leucócitos/campo superior aos aptos. A análise de regressão logística revelou que os touros inaptos têm 6,5 vezes mais chances de apresentarem maior quantidade de leucócitos do que os aptos. A contagem de leucócitos em esfregaço seminal mostrou-se um método eficiente, prático e acessível para investigação de problemas de fertilidade. Contagens de até 1 leucócito/campo no ejaculado são consideradas fisiológicas e valores superiores a cinco podem ser associados à baixa qualidade seminal.

Palavras-chave: Leucócitos; concentração leucocitária; sêmen; bovinos.

## Abstract

ZART. A.L. Seminal leukocitary profile in beef bulls. 2013. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Leukocytes are commonly found in bovine semen, but their role in seminal plasma is not well understood. Despite of the evidences that seminal leukocytes could affect semen quality, lacks references for frequency and concentration of these cells in bulls. The aim of this study was to determine the normal concentration and leukocitary profile of beef bulls, correlating these characteristics with semen quality. Firstly, 57 bulls from three different Artificial Insemination Centers were evaluated to obtain the normal leukocitary profile values. In a second step, 382 bulls were submitted to breeding soundness evaluation. After seminal analysis and leukocyte count, they were classified according reproductive condition. The average concentration of leukocytes in bovine semen was  $4.73 \times 10^6/\text{mL}$ . Unsatisfactory bulls had more leukocyte/field than satisfactory ones. Logistic regression analysis revealed that the unsatisfactory bulls have 6.5 times more chances to have higher leukocyte counts than satisfactory ones. Leukocitary count in seminal smear proved to be an efficient and practical test for fertility problems investigation. Values of up to 1 leukocyte/field in the bull ejaculate are considered physiological and when exceeding five may be associated with poor semen quality.

Keywords: Leukocyte; WBC; leukocyte count; semen; bovine.



## Lista de ilustrações

- Figura 1 - Percentual de células leucocitárias no sêmen de touros de corte de acordo com a condição reprodutiva..... 27
- Figura 2 - Número de Leucócitos por campo de microscopia (400x) de touros sintéticos e zebuínos de acordo com a condição reprodutiva..... 27

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Médias ( $\pm$ epm) das características seminais, concentração e perfil leucocitário seminal de touros pertencentes a centrais de coleta e processamento de sêmen.....	28
Tabela 2 - Médias ( $\pm$ epm) de diferentes características seminais e perímetro escrotal de acordo com a condição reprodutiva em touros de corte no Mato Grosso do Sul.....	29
Tabela 3 - Frequência de cada classificação para leucócitos/campo de acordo com a condição reprodutiva em touros de corte.....	29
Tabela 4 - Estimativa da taxa de risco (odds ratio) para touros inaptos de acordo com as categorias de leucócitos e o genótipo.....	30

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Exame Andrológico.....	2
Leucócitos no sêmen.....	3
Migração leucocitária endotelial.....	3
Leucócitos testiculares e nos ductos extragonadaís.....	4
Perfil leucocitário em processos patológicos reprodutivos.....	6
Estresse Oxidativo.....	7
Leucócitos seminais no touro.....	9
Referências.....	10
PERFIL LEUCOCITÁRIO SEMINAL EM TOUROS DE CORTE.....	14
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	15
Material e métodos.....	16
Experimento 1.....	16
Experimento 2.....	17
Resultados.....	18
Experimento 1.....	18
Experimento 2.....	19
Discussão.....	19
Conclusão.....	22
Agradecimentos.....	22
Referências.....	23
Figuras.....	27
Tabelas.....	28

## 1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva do rebanho está diretamente associada à produtividade e a rentabilidade em qualquer sistema de produção. Assim, a fertilidade é, inquestionavelmente, uma das mais importantes características a ser considerada, tanto nos sistemas produtivos de carne quanto nos de leite. Como um touro pode se acasalar com número muito maior de fêmeas, tanto na monta natural como na inseminação artificial, é claro que a importância da fertilidade do macho é muito maior do que a de qualquer fêmea individualmente.

Diversos estudos mostram uma expressiva frequência de descarte de animais por alterações clínico-genitais (Vale Filho et al., 1986; Kennedy et al., 2002) e por características seminais indesejáveis (Fitzpatrick et al., 2002; Moraes et al., 1998). Estudos no Mato Grosso do Sul demonstram que a frequência de touros inaptos, somente por restrições seminais, avaliados previamente à introdução em rebanhos de cria, pode variar de 15 a 20% (Fernandes et al., 2003; Nogueira et al., 2006). Neste sentido, o exame andrológico torna-se fundamental para classificação e prognóstico da função reprodutiva, ao proporcionar a eliminação de animais inférteis ou subférteis e, possivelmente, elencar indivíduos de maior eficiência reprodutiva.

Dentre os componentes do exame andrológico, a avaliação do sêmen é o mais importante, uma vez que a definição dos padrões de qualidade seminal permite diagnosticar diversas alterações no sistema reprodutivo (Pimentel, 2001). A definição dos padrões de qualidade seminal sustenta-se na origem e na proporção de espermatozoides morfológicamente anormais, definindo padrões repetitivos ou não, de acordo com a condição clínica do sistema reprodutivo. Porém, além dos espermatozoides, o sêmen contém outras estruturas coletivamente conhecidas como células não espermáticas, compostas por células epiteliais do trato genito-urinário, células germinativas imaturas, além dos leucócitos.

Os leucócitos, no trato reprodutivo do macho, estão presentes principalmente no epidídimo (Barratt et al., 1990). Embora ainda não se saiba exatamente o quanto os leucócitos interferem na qualidade seminal, sabe-se que eles estão envolvidos nos processos de fagocitose de espermatozoides anormais e imunovigilância dos órgãos do sistema reprodutivo (Aziz et al., 2004). Diante disso, essa revisão tem como objetivo relatar a importância e a função leucocitária no sêmen, abordando suas relações com as características seminais em touros de corte.

## 1.1 EXAME ANDROLÓGICO

O exame andrológico tem como principal objetivo prever a capacidade e o potencial reprodutivo de touros através da avaliação das condições físicas gerais e específicas do aparelho reprodutivo, juntamente com as características do ejaculado. A fertilidade do macho é uma das mais importantes características em um rebanho de corte, principalmente em criações extensivas em que a reprodução constitui fator limitante à produção. A seleção de reprodutores é fundamental também para o melhoramento genético dos rebanhos bovinos. Durante sua vida útil, um touro pode deixar entre 100 e 300 bezerros, dependendo da relação touro:vaca utilizada e dos índices de prenhez durante o período (Amaral et al., 2003). Com o exame andrológico, animais com problemas reprodutivos podem ser afastados do rebanho e evitar que características indesejáveis sejam transmitidas aos seus descendentes.

No exame do sêmen, a definição dos padrões de qualidade seminal sustenta-se na proporção de células móveis (motilidade e vigor) e na morfologia espermática (espermatozoides normais), embora tenham sido descritos a mais de 70 anos no touro (Langerlöf, 1934). Dentre as variáveis seminais identificadas e avaliadas no espermograma, a motilidade e a morfologia espermática ainda são as mais importantes para a estimativa da fertilidade. Holroyd et al. (1993) encontraram uma correlação significativa entre a porcentagem de espermatozoides móveis e o índice de prenhez em touros *Bos Indicus*. Em outro estudo com touros de três genótipos diferentes (*B. Indicus*, *B. Taurus* e *B. Indicus X B. Taurus*) aqueles que tinham <50% de espermatozoides normais geraram poucos bezerros enquanto os touros que deixaram maior número de descendentes tinham > 70% de espermatozoides normais (Fitzpatrick et al., 2002).

Variações nos padrões seminais podem estar associadas a fatores nutricionais, raciais, ambientais, farmacológicos, sanitários ou de manejo, ocorrendo de forma transitória ou permanente. Nessas situações, geralmente há indícios de redução na qualidade seminal (Snoj et al., 2013). Um exemplo desse aspecto pode ser visto na avaliação seminal de touros em repouso sexual, após longos períodos do término de uma estação reprodutiva. Nesses casos, em geral, há um acúmulo de espermatozoides velhos na cauda do epidídimo e consequente redução de motilidade, vigor e aumento na prevalência de defeitos de cauda. Porém, após um ou dois ejaculados há notadamente uma melhora no quadro seminal. Portanto, as variações devem ser interpretadas de acordo com vários fatores minuciosamente observados durante a realização do exame andrológico.

Uma série de critérios e padrões têm sido estipulados com o objetivo de facilitar e concluir sobre as características seminais observadas no exame andrológico. A interpretação dos resultados inclui aspectos da fisiologia, patologia e semiologia do aparelho reprodutivo o que, de certa forma, torna-se um exercício complexo, necessitando frequentemente de novas avaliações seminais. Independente do sistema adotado para interpretação do quadro seminal, tais como defeitos maiores e menores, primários e secundários, ou compensáveis e não compensáveis, os resultados devem ser considerados com base nos conhecimentos sobre espermatogênese, transporte e armazenamento epididimal, para fins de diagnóstico e prognóstico da função reprodutiva.

## **1.2 LEUCÓCITOS NO SÊMEN**

Segundo a Organização Mundial da Saúde a presença de leucócitos no sêmen é conhecida como leucocitoespermia e corresponde a valores superiores a  $1 \times 10^6 / \text{mm}^3$  (Aziz et al., 2004). No homem, aproximadamente 20% da população infértil é positiva para esse exame. Junto a análise quantitativa, o perfil leucocitário em esfregaços de sêmen também tem sido usados como suporte ao espermograma (Henkel et al., 2005). Em bovinos e outras espécies domésticas, no entanto, não há descrição desses parâmetros, embora sejam evidentes nos quadros infecciosos testiculares, nos ductos extragonadais, vesícula seminal, uretra, e nas doenças transmitidas pela reprodução, com notada redução dos índices de fertilidade (McEntee, 1990; Hopkins, 1997). O perfil leucocitário bem como sua prevalência no sêmen de touros com ou sem alterações no espermograma não são conhecidos. Supõe-se que os efeitos do trânsito e armazenamento epididimal juntamente com demais aspectos relativos à função gonadal estejam relacionados às variações no espermograma e também influencie na quantidade de leucócitos presentes no ejaculado, tendo assim, significado clínico importante no diagnóstico da função reprodutiva.

### **1.2.1 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA ENDOTELIAL**

Leucócitos são células de defesa imunológica e participam de diversos fenômenos ligados aos processos de reconhecimento, quimiotaxia, fagocitose e reparação tecidual. Embora os leucócitos não sejam observados nos tecidos apenas nos processos reativos inflamatórios, sua presença geralmente é comum em percentuais muito baixos. No epitélio do aparelho reprodutivo, incluindo *rete testis*, ductos eferentes, cabeça, corpo e cauda do

epidídimo, ducto deferente e uretra peniana, há mobilização leucocitária em direção aos tecidos conectivos e porção luminal (Goyal, 1982).

A migração leucocitária dos capilares para o tecido conectivo ou até mesmo para o foco lesivo ocorre a partir do processo de adesão e ligação dessas células no endotélio capilar. Esse processo, conhecido como diapedese, é estimulado pela transudação de líquidos para o meio extracapilar juntamente com o aumento da permeabilidade vascular e fenestração entre as células endoteliais (Bazzoni & Dejana, 2004). Nos neutrófilos, linfócitos e macrófagos, moléculas de adesão (L-selectinas e P-selectinas) presentes na membrana se ligam aos seus receptores endoteliais. Após a adesão, os leucócitos rolam no endotélio mediante expressão da L-selectina e P-selectina e se modulam às fenestrações endoteliais se fixando firmemente nessas células. Interleucina-1, 6 (IL-1 e 6), fator de necrose tumoral (TNF), sistema complemento (C5a) e fator ativador plaquetário (PAF) são citocinas importantes nesta fase, em resposta a estímulos lesivos. Em seguida, os leucócitos transmigram para o meio extracapilar mediante expressão das integrinas LFA-1 e Mac-1 e iniciam o processo de fagocitose (Ackermann, 2007; Friedl & Weigelin, 2008).

### **1.2.2 LEUCÓCITOS TESTICULARES E NOS DUCTOS EXTRAGONADAIS**

Os leucócitos são encontrados em todos os tecidos dos mamíferos, inclusive no sistema reprodutivo de fêmeas e machos. Nos machos essas células estão presentes principalmente no estroma testicular e no epidídimo (Barratt et al., 1990). Em condições fisiológicas há presença de moderada infiltração focal e difusa de neutrófilos e linfócitos no tecido intersticial dos ductos eferentes dos animais domésticos. A razão desses achados ainda não é totalmente compreendida, mas está associada à característica da população espermática armazenada nessas regiões, assim como a atividade de defesa celular (McEntee, 1990). Na cauda do epidídimo, onde há um processo degenerativo espermático, principalmente em touros em repouso sexual, os infiltrados linfomononucleares são mais frequentes e sugerem uma barreira imunológica natural nesse segmento do sistema reprodutivo (McEntee, 1990).

No parênquima testicular, os leucócitos são encontrados no estroma, ou seja, na região intersticial, rica em capilares arteriais, venosos e linfáticos. Mesmo assim, na maioria das espécies domésticas, a atividade fagocítica nessa região é escassa (Itoh et al., 2005). Em casos de traumatismo e inflamação aguda, há possibilidade de invasão dessas células no epitélio dos túbulos seminíferos. Como as células germinativas são consideradas estranhas ao sistema imune devido à barreira hematocelular, haverá perda na eficiência da espermatogênese e

consequente queda na produção espermática, além da formação de anticorpos contra células germinativas nos diferentes estágios do ciclo espermato gênico (Hutson, 1994). Um exemplo é a infecção por *Trypanosoma vivax* que induz a um rápido quadro degenerativo testicular com severa infiltração leucocitária e redução da concentração espermática (Adamu et al., 2007).

Na *rete testis* e ducto eferente de touros também há evidências de fagocitose por macrófagos e presença de linfócitos sentinelas (Sinowitz et al., 1979). Ambos os epitélios são do tipo escamoso colunar com membrana basal relativamente espessada. A superfície apical das células epiteliais possui pequenas microvilosidades e, ocasionalmente, um flagelo que auxilia o transporte espermático. Linfócitos e macrófagos localizam-se na região basal do epitélio e tem sido responsáveis pela fagocitose de células espermáticas degeneradas como um processo natural seletivo em touros clinicamente saudáveis. Esse processo é conhecido como espermiófagia e é mais prevalente na *rete testis* (75%) em relação ao ducto eferente (20%) e possivelmente esteja relacionado com a seleção espermática de células anormais (Goyal, 1982).

No epidídimo, a transmigração leucocitária é maior e mais ativa em relação aos demais segmentos dos ductos extragonadaís. Isso se deve, possivelmente, pela maior passagem de fluídos, proteínas e concentração de células espermáticas. Macrófagos são os mais abundantes e localizam-se, predominantemente, no interstício peritubular, com frequente migração para o lúmen epididimal. Embora a função exata dessas células não seja totalmente conhecida, sua presença está relacionada à fagocitose seletiva nos diferentes segmentos epididimais, uma vez que touros que apresentam maior percentual de anormalidades morfológicas tendem a apresentar maior população leucocitária no lúmen epididimal (Roussel et al., 1967; Serre & Robaire, 2002).

A função do epitélio epididimal varia entre exocitose, endocitose e secreção de substâncias para o lúmen. Neste contexto, três regiões são caracterizadas do ponto de vista histológico: cabeça, corpo e cauda. Mesmo que cada região apresente funções relativamente distintas, a composição celular é semelhante (Hermo et al., 1994). Do conjunto de células leucocitárias encontradas no epidídimo, linfócitos T auxiliares (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e monócitos-macrófagos (ED1+) são reconhecidos como células halo (*halo cells*) e distribuem-se em todo epitélio, especialmente nas porções basais e adluminais (Serre & Robaire, 2002). Desta forma, é frequente a presença dessas células no lúmen epididimal e, conseqüentemente, junto ao sêmen. Por outro lado, essas características citológicas se relacionam com a capacidade de fagocitose nessas regiões, especialmente na cabeça e corpo do epidídimo. Em ambas as regiões há secreção de ubiquitina, uma proteína



proteolítica, responsável pela marcação de células a serem fagocitadas (Santamaria et al., 1993). No touro, a taxa de espermatozóides recuperados pela via dependente da ubiquitina-proteolítica varia de 0,4 na *rete testis* a 5,3 na cabeça e 0,8 na cauda do epidídimo (Sutovsky et al., 2001).

### **1.2.3 PERFIL LEUCOCITÁRIO EM PROCESSOS PATOLÓGICOS REPRODUTIVOS**

Processos patológicos representam a maior causa de subfertilidade e infertilidade do touro (Pimentel, 2001). Destes, a degeneração testicular, a hipoplasia gonadal e os processos inflamatórios têm sido amplamente descritos na literatura. De maneira geral, as patologias que afetam os testículos podem ser congênitas, genéticas ou adquiridas, uni ou bilaterais, temporárias (reversíveis) ou permanentes (irreversíveis). 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 (McEntee, 1990). Alterações iniciais consistem de perda total ou parcial da camada de células primordiais e presença de células gigantes multinucleadas. Segundo Rao et al. (1980), o processo degenerativo ocorre em diversos pontos do epitélio seminífero, atingindo diferentes segmentos e pode variar desde a ausência de lúmen, hiperplasia de células de Leydig, presença apenas da membrana basal até a completa calcificação epitelial. Além disso, é comum que a degeneração se estenda até a cabeça do epidídimo, formando alterações histológicas importantes. Essas alterações resultam em hipóxia tecidual, produção de radicais livres e deterioração do ambiente do epitélio seminífero e possivelmente dos segmentos epididimais (Setchel, 1998). Portanto, a presença de leucócitos seminais pode ser um indicador de alterações no trânsito epididimal ou revelar alterações intrínsecas à função gonadal.

A despeito dos processos inflamatórios, tanto de cunho infeccioso quanto traumático, a literatura tem mostrado índices extremamente variados (Fernandes & Moraes, 2009; Kennedy et al., 2002). Isso se deve as diversas condições de manejo a que os animais são submetidos, especialmente em sistemas produtivos com grande número de animais, diferença de idade, raça, entre outros. Contudo, os processos inflamatórios representam baixa percentagem de descarte entre reprodutores de corte, estando abaixo da degeneração testicular e hipoplasia gonadal (Nogueira et al., 2006). Dos processos inflamatórios com reflexo na qualidade seminal, a vesiculite e a ampolite dos ductos deferentes tem sido reportadas como as mais prevalentes (Hull & Vogel, 2008). Geralmente ocorrem em touros mais jovens e estão

associadas a contaminação por *Brucella abortus*, *Actinomyces pyogenes* e *Haemophilus somni* (Groteluechen et al. 1994). Nesses touros, embora a sintomatologia seja variada, a presença de polimorfonucleares no sêmen, indicativo de processo agudo, é comum, incluindo a presença de alterações de coloração e aspecto seminal, ou até mesmo de exudato purulento (Hopkins, 1997).

Assim, é possível que a presença de processos inflamatórios, infecciosos ou degenerativos tanto no ambiente testicular e epididimário, quanto nos órgãos anexos que compõe o trato reprodutivo do macho, como próstata, vesículas seminais e ductos deferentes estimulem gradualmente a migração de células inflamatórias para o lúmen tubular e, posteriormente, sejam identificadas no líquido seminal. No entanto, essas patologias não são diagnosticadas com frequência em bovinos. Em humanos, os estudos relacionados à leucocitospermia mostram que há evidência de sua presença na redução da fertilidade e qualidade seminal, independente de alterações de caráter inflamatórias (Menkveld, 2004). Isto sugere que há trânsito leucocitário no epitélio epididimal e, possivelmente, esteja envolvido com a presença de espermatozoides anormais. Porém, nos bovinos, a frequência da leucocitospermia sem a presença de sintomas clínicos e associação com o quadro seminal ainda são desconhecidas.

#### 1.2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas ao oxigênio, conhecidas como ROS (Reactive Oxygen Species), constituem uma série de metabólitos que são derivados da redução do oxigênio, incluindo radicais livres, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), assim como poderosos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Aitken & Bennetts, 2006). Os efeitos adversos desses agentes no sêmen foram identificados pela primeira vez em 1971 por Thaddeus Mann e seus colaboradores na Universidade de Cambridge na Inglaterra (Aitken & De Iuliis, 2010). A geração de baixos níveis de ROS é necessária para regular a atividade de genes e proteínas vitais para diferenciação e função das células espermáticas (Andrabi, 2007), assim como para o processo de capacitação espermática (Aitken & Bennetts, 2006). Porém em concentração elevada podem causar sérios danos tanto à membrana celular quanto ao DNA dos espermatozoides.

A membrana celular dos espermatozoides é altamente suscetível ao estresse oxidativo porque contém alta concentração de ácidos graxos insaturados, os quais são necessários para fornecer fluidez à membrana plasmática (Henkel et al., 2003; Muraro et al., 2007). Esses

ácidos graxos insaturados sofrem um processo de peroxidação lipídica, que leva à perda da integridade e estabilidade da membrana que reveste a célula espermática, causando uma drástica diminuição da motilidade e perda da função espermática.

Além dos danos à membrana celular, os ROS podem causar defeitos na integridade da cromatina espermática e ao genoma mitocondrial. O DNA mitocondrial é muito mais suscetível a danos do que o DNA nuclear, porém como este não possui uma contribuição expressiva para a funcionalidade do espermatozóide ou no desenvolvimento subsequente do embrião, este dano tem pouca importância biológica (Aitken & Bennetts, 2006). Já o DNA do núcleo espermático, por ser fortemente compactado com protaminas e possuir uma maior estabilização devido às pontes dissulfídicas inter e intramoleculares, é consideravelmente mais resistente a lesões (Aitken & De Iuliis, 2010). Entretanto, ainda assim os ROS podem causar danos ao DNA da células espermática.

O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo danifica o DNA espermático ainda não foi totalmente esclarecido, nesse sentido várias hipóteses vêm sendo especuladas. Segundo Aitken et al. (2008), ROS induzem reações de redução nas ligações nucleotídicas da cromatina espermática, provocando um enfraquecimento na estrutura e consequentes rupturas na fita de DNA. Outra possibilidade é que o estresse oxidativo desencadeie uma cascata de apoptose nos espermatozóides, levando à ativação de caspases e a estimulação da atividade de endonucleases, que então clivam o DNA (Aitken et al., 2008). Além disso, de acordo com Aitken & De Iuliis (2010), a cascata de danos ao DNA tem origem na espermiogênese quando o DNA começa a ser remodelado antes da condensação. Defeitos nesse processo provocam um estado de vulnerabilidade na cromatina que pode, facilmente, sofrer ataques dos ROS. Barroso et al. (2000) encontraram uma forte correlação positiva entre os níveis de ROS no sêmen humano e a fragmentação do DNA nuclear. Assim como em outros estudos em que os espermatozóides expostos a altas concentrações de ROS apresentaram um aumento significativo no dano ao DNA (Twigg et al., 1998; Duru et al., 2000). Nos bovinos, tais efeitos não são totalmente conhecidos. Fernandes et al. (2008) demonstraram a dinâmica da fragmentação nuclear e de alterações na cromatina espermática em bovinos submetidos à degeneração testicular experimental. Prevalências superiores foram observadas a partir do sétimo dia após insulto testicular em conjunto à alta variabilidade do perfil proteico seminal.

A presença de leucócitos no ambiente epididimal e fluído seminal tem sido associada a níveis variados de radicais livres (ROS) com prejuízos importantes na qualidade seminal e fertilidade. Em geral, tanto a presença de leucócitos, quanto a de espermatozóides anormais no ambiente epididimal favorece a formação de radicais livres. Porém, os leucócitos são

capazes de gerar pelo menos 1000 vezes mais ROS do que os espermatozóides (Henkel et al., 2005). Como essas células são grandes geradoras de ROS, sem dúvida, possuem uma grande contribuição no estresse oxidativo sofrido pelas células espermáticas.

Os leucócitos, durante sua função fisiológica normal de imunovigilância e fagocitose, liberam para o meio grande quantidade de radicais livres que podem atacar os espermatozóides. Para que isso ocorra são necessários diversos fatores, tais como: a concentração e o subtipo de leucócitos envolvidos, quando e onde eles foram ativados e o quão eficiente é a proteção dos antioxidantes do trato reprodutivo (Aitken & De Iuliis, 2010).

Quando os leucócitos são provenientes das glândulas sexuais secundárias, como a próstata e vesícula seminal, o primeiro contato dos espermatozóides com essas células ocorre no momento da ejaculação. Neste caso os antioxidantes presentes no plasma seminal atuam na contenção desses radicais livres. Assim, o impacto do estresse oxidativo na funcionalidade do espermatozóide e no dano ao DNA nuclear são minimizados (Aitken & De Iuliis, 2010). Entretanto, quando a infiltração de leucócitos é próxima aos testículos ou epidídimos, o contato prolongado dos ROS gerados pelos leucócitos ativados com as células espermáticas consomem os antioxidantes locais e a proteção contra o estresse oxidativo fica prejudicada. Nessas circunstâncias apenas poucos leucócitos já são suficientes para induzir danos ao DNA (Alvarez et al., 2002; Aitken & De Iuliis, 2010).

### **1.2.5 LEUCÓCITOS SEMINAIS NO TOURO**

Apesar de existirem uma série de trabalhos publicados sobre as possíveis correlações envolvendo leucócitos e os parâmetros seminais no ser humano, em bovinos esse tema ainda foi pouco explorado. Durante o exame de morfologia espermática de touros é comum se observar células leucocitárias em meio aos espermatozóides. Como não existem informações que definam qual o tipo celular e os valores considerados normais para a espécie, geralmente esse achado é desconsiderado. Assim, os leucócitos são associados apenas a casos de traumas ou inflamações no aparelho reprodutivo e a degenerações testiculares severas (McEntee, 1990, Hull & Vogel, 2008).

Buscando auxiliar na determinação do diagnóstico da subfertilidade ou infertilidade no touro, o artigo apresentado a seguir teve como objetivo estabelecer o padrão de concentração e o perfil leucocitário da espécie bovina de acordo com qualidade seminal em touros de corte.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. Acute inflammation. In: MCGAVIN, M. D.; ZAHCARY, J. F. *Pathologic basis of veterinary disease*, 4 ed., Elsevier, St. Louis, MI, p.101-152. 2007.
- ADAMU, S.; FATIHU, M.Y.; USEH, N.M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V.O.; ESIEVO, K.A. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary Parasitology*, v.143, n.1, p.29-34, 2007.
- AITKEN, R. J.; BENNETTS, L. Reactive oxygen species: friend or foe. In: DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. L. R. *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration..* Cambridge University Press, New York, USA, p. 170-193. 2006.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, v.16, n.1, p.3-13, 2010.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; MCLACHLAN, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal Andrology*, v.32, p.46-56, 2008.
- ALVAREZ, J. G.; SHARMA, R. K.; OLLERO, M.; SALEH, R. H.; LOPEZ, M. C.; THOMAS, A. J. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, v.78, p.319-329, 2002.
- AMARAL, T. B.; CORREA, E. S.; COSTA, F. P. Aspectos econômicos do uso de touros melhoradores em um sistema de produção de gado de corte. In: *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 40, 2003, Santa Maria - RS. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003. (CD-ROM).
- ANDRABI, S. M. H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.24, p.561-569, 2007.
- AZIZ, N.; AGARWAL, A.; LEWIS-JONES, I.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J. Novel association between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertility and Sterility*, v.82, n.3, p.621-627, 2004.
- BARRATT, C. L.; BOLTON, A. E.; COOKE, I. D. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, v.5, p.639-48, 1990.
- BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.15, n.6, p.1338-1344, 2000.
- BAZZONI, G.; DEJANE, E. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiology Review*, v.84, p.869-901, 2004.
- DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, v.74, p.1200-1207, 2000.

- FERNANDES, C.E.; POMPEO, M.; LEAL, C. Caracterização do espermograma e aspectos da biometria testicular em touros Brangus (3/8 Zebu). In: *Anais... 5 Congresso Brasileiro de Buiatria*. Salvador, BA. p.78, 2003.
- FERNANDES, C. E; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v.70, p.1560-1568, 2008.
- FERNANDES, C. E.; MORAES, J. C. F. Avaliação Clínica e Exame de Sêmen no Touro. In: AMARAL, T. B.; SERENO, J. R. B.; PELLEGRIN, A. O. *Fertilidade, Funcionalidade e Genética de Touros Zebuínos*, 1 ed., Embrapa Pantanal, Corumbá, 2009.
- FITZPATRICK, L.A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; DOOGANE, V.J.; DE FAVERIF, J.; MILLER, R.G.; HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. *Animal Reproduction Science*, v.71, p.39–49, 2002.
- FRIEDL, P.; WEIGELIN, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature immunology*, v 9, n.9, p.960-969, 2008.
- GOYAL, H.O. Light microscopic and ultrastructural evidence of epithelial phagocytosis of sperm in the rete testis and ductuli efferentes in the bull. *American Journal of Veterinary Reserch*, v.43, n.5, p.785-790, 1982.
- GROTELUECHEN, D.; MORTIMER, R.; ELLIS, R. Vesicular adenitis syndrome in beef bulls. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.205, p.874-879, 1994.
- HENKEL, R.; MAASS, G.; HAJIMOHAMMAD, M.; MENKVELD, R.; STALF, T.; VILLEGAS, J. Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*, v.35, p.309–13, 2003.
- HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; STALF, T.; MEHNERT, C.; MENKVELD, R.; TINNEBERG, H. R.; SCHILL, W. B.; KRUGER, T. F. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, v.83, n.3, p.635-642, 2005.
- HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *International Review of Cytology*, v.154, p.105-189, 1994.
- HOLROYD, R. G.; ENTWISTLE, K. W.; SHEPHERD, R. K. Effects on reproduction of estruos cycle variation, rectal temperatures and liveweights in mate d Brahman cross heifers. *Theriogenology*, v. 40, p.453-464, 1993.
- HOPKINS, F. M. Diseases of the reproductive system of the bull. In.: YOUNGQUIST, R. S. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Sauders Company, 1Ed., p.237-239, 1997.
- HULL, B. L.; VOGEL, S. R. Seminal Vesiculitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 24, p. 267-272, 2008.
- HUTSON, J. C. Testicular macrophages. *International Review of Cytology*, v.149, p.99-143, 1994.

- ITOH, M.; TERAYAMA, H.; NAITO, M.; OGAWA, Y.; TAINOSHO, S.; Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *Journal of Reproductive Immunology*, v.67, p.57-67, 2005.
- KENNEDY, S. P.; SPITZER, J. C.; HOPKINS, F. M.; HIGDON, H. L.; BRIDGES, W. C. Jr. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriogenology*, v.58, p.947-961. 2002.
- 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.
- MCENTEE, K. Reproductive pathology of domestic animals. Academic Press, San Diego, CA. 401 p. 1990.
- MENKVELD, R. Leukocytospermia. *International Congress Series*, v. 1266, p. 218-224. 2004.
- MORAES, J. C. F.; HORN, M. M.; ROSADO, J. R. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. *Ciência Rural*, v.28, n.4, p.647-652, 1998.
- MURARO, F.; HENNEMANN, T. C.; ANZOLCH, K. J.; OLIVEIRA, O. L. M. Effect of polymorphonuclear leucocytes on semen analysis. *Anais... 39 Congresso Brasileiro de Análises Clínicas*, v.39(1), p.47-50, 2007.
- NOGUEIRA, E.; FERNANDES, C. E.; COSTA E SILVA, E. V; SILVA, A.S. Comparação de perfil andrológico de 4443 touros Nelore criados extensivamente no planalto e pantanal sulmatogrossense. In.: *Anais... 43 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. João Pessoa, PB. p.1-4, CD Rom, 2006.
- 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*, v.2, Varela, São Paulo, SP, p.382-399, 2001.
- RAO, R A.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage throught the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, v.14, p.1-12, 1980.
- ROUSSEL, J. D.; STALLCUP, O. T.; AUSTIN, C. R. Selective phagocytosis of spermatozoa in the epididymis of bulls, rabbits and monkeys. *Fetility and Sterility*, v.18, p.509-516, 1967.
- SANTAMARIA, L.; MARTIN, R.; PANIAGUA, R.; FRAILE, B.; NISTAL, M.; TERENGI, G.; POLAK, J. M. Protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in rat epididymis epithelium. *Histochemistry*, v.100, p.131-138, 1993.
- SERRE, V.; ROBAIRE, B. Interations of the immune system and the epididymis. In.: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. *The Epididymis from Molecules to Clinical Practice*, Kluwer Academic, New York, USA, p.219-231, 2002.
- SETCHELL, B. P. Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.114, p.179-194, 1998.

SINOWATZ, F.; WROBEL, W. H.; SIONWATZ, S. Ultrastructural evidence for phagocytosis of spermatozoa in the bovine rete testis and testicular straight tubules. *Journal Reproduction and Fertility*, v.57, p.1-4, 1979.

SNOJ, T.; KOBAL, S.; MAJDIC, G. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology*, In Press 2013.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; THOMPSON, W. E.; SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science*, v.114, p.1665-1675, 2001.

TWIGG, J. P.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v.13, p.1864–1871, 1998.

VALE-FILHO, V. R.; PINHEIRO, L. E. L.; BASUR, P. K. Reproduction in zebu cattle. In.: Morrow, D.A. *Current therapy in theriogenology*, 2a ed. Philadelphia, Saunders, p.437-442, 1986.



## ARTIGO

### Perfil leucocitário seminal em touros de corte

#### Seminal leukocitary profile in beef bulls

Adriane Lermen Zart<sup>1\*</sup>; Carlos Eurico dos Santos Fernandes<sup>2</sup>

Trabalho redigido sob as normas de publicação da Revista Semina: Ciências Agrárias -  
Universidade Estadual de Londrina

#### Resumo

As células leucocitárias são comumente encontradas no ejaculado de touros, porém o seu papel no plasma seminal ainda não está bem definido. Existem evidências de que a presença de leucócitos no sêmen afete a qualidade do ejaculado, porém, faltam valores de referência para frequência e concentração dessas células na espécie bovina. Diante disso, esse estudo teve como objetivo estabelecer o padrão de concentração e o perfil leucocitário de touros de corte, associando-os à qualidade seminal. Em uma primeira etapa, 57 touros de centrais de coleta e processamento de sêmen foram avaliados para se obter o padrão leucocitário da espécie. Posteriormente 382 touros criados de forma extensiva foram submetidos ao exame andrológico, classificados quanto à aptidão reprodutiva e tiveram o perfil leucocitário seminal estimado. A concentração média de células leucocitárias na espécie bovina foi de  $4,73 \times 10^6/\text{mL}$  de sêmen. Touros inaptos apresentaram uma média de leucócitos/campo superior aos aptos. A análise de regressão logística revelou que os touros inaptos têm 6,5 vezes mais chances de apresentarem maior quantidade de leucócitos do que os aptos. A contagem de leucócitos em esfregaço seminal mostrou-se um método eficiente, prático e acessível para investigação de problemas de fertilidade. Quantidades de até 1 leucócito/campo no ejaculado são consideradas fisiológicas e quando superiores a cinco podem estar associada à baixa qualidade seminal.

**Palavras-chave:** Leucócitos, concentração leucocitária, sêmen, bovinos.

---

<sup>1</sup> Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil. [adrizart@gmail.com](mailto:adrizart@gmail.com)

<sup>2</sup> Centro de Ciência Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil. [carlos.fernandes@ufms.br](mailto:carlos.fernandes@ufms.br)

\* Autor para correspondência

## Abstract

Leukocytes are commonly found in bovine semen, but their role in seminal plasma is not well understood. Despite of the evidences that seminal leukocytes could affect semen quality, lacks references for frequency and concentration of these cells in bulls. The aim of this study was to determine the normal concentration and leukocytary profile of beef bulls, correlating these characteristics with semen quality. Firstly, 57 bulls from three different Artificial Insemination Centers were evaluated to obtain the normal leukocytary profile values. In a second step, 382 bulls were submitted to breeding soundness evaluation. After seminal analysis and leukocyte count, they were classified according reproductive condition. The average concentration of leukocytes in bovine semen was  $4.73 \times 10^6/\text{mL}$ . Unsatisfactory bulls had more leukocyte/field than satisfactory ones. Logistic regression analysis revealed that the unsatisfactory bulls have 6.5 times more chances to have higher leukocyte counts than satisfactory ones. Leukocytary count in seminal smear proved to be an efficient and practical test for fertility problems investigation. Values of up to 1 leukocyte/field in the bull ejaculate are considered physiological and when exceeding five may be associated with poor semen quality.

**Key words:** Leukocyte, WBC, white blood cells, leukocyte count, semen, bovine.

## Introdução

O sêmen dos mamíferos contém, além dos espermatozóides e secreções das glândulas acessórias, outros tipos celulares coletivamente conhecidos como células redondas. Entre elas, incluem-se leucócitos, células epiteliais e vários estágios de células germinativas imaturas. Os leucócitos, no trato reprodutivo do macho, estão presentes principalmente no estroma testicular e no epidídimo (BARRATT; BOLTON; COOKE, 1990). Embora ainda não se saiba exatamente o quanto os leucócitos interferem na qualidade seminal, sabe-se que eles estão envolvidos nos processos de fagocitose de espermatozóides anormais e imunovigilância do trato reprodutivo (AZIZ et al., 2004).

Embora existam vários estudos na medicina humana, os efeitos que os leucócitos acarretam nos parâmetros seminais permanecem indefinidos. Os trabalhos publicados até o momento apresentam uma série de contradições em seus resultados. Alguns estudos correlacionaram a leucocitospermia com baixa qualidade seminal (THOMAS et al., 1997; ARATA DE BELLABARBA et al., 2000; AZIZ et al., 2004), enquanto outros não encontraram qualquer associação (KALELI et al., 2000; RODIM; LARONE; GOLDSTEIN, 2003). Já Tomlinson et al. (1992), Kiessling et al. (1995) e Ricci et al. (2002) reportaram maiores proporções de espermatozóides com morfologia normal em amostras com mais leucócitos no sêmen.

Os mecanismos pelos quais os leucócitos podem interferir na qualidade do ejaculado ainda não estão bem esclarecidos. Acredita-se que os efeitos negativos dessas células no sêmen sejam causados

pela produção excessiva de radicais livres (ROS - espécies reativas ao oxigênio), tóxicos ao espermatozóide. Os ROS, ao entrarem em contato com a célula espermática, provocam a perda da integridade e estabilidade da membrana celular, resultando em queda na motilidade e em defeitos na cromatina espermática (ALVAREZ et al., 2002). Os efeitos positivos podem ser explicados pela capacidade dos leucócitos de fagocitar células espermáticas degeneradas no trato reprodutivo masculino (TOMLINSON et al., 1992). Depois de saírem do testículo via *rete testis*, os espermatozoides seguem para o epidídimo, onde sofrem intensas modificações morfológicas e bioquímicas durante o processo de maturação. Ao longo do trânsito epididimal, resíduos citoplasmáticos, formas anormais e espermatozoides decapitados são seletivamente removidos do sêmen, principalmente pelos macrófagos (SUTOVSKY et al., 2001).

No touro, geralmente a presença de leucócito no sêmen está associada a processos inflamatórios, infecciosos ou degenerativos no testículo, epidídimo, ou mesmo nas glândulas acessórias (MCENTEE, 1990). No entanto, essas patologias não são diagnosticadas com frequência na rotina das avaliações andrológicas (KENNEDY et al., 2002; FERNANDES; MORAES, 2009). Além disso, não há na literatura valores de referência para concentração de células leucocitárias e um limite no qual se deva suspeitar de infecção, assim como já foi descrito para outras espécies (humanos, ovinos e caninos). Faltam também informações sobre a existência de associação entre a qualidade do ejaculado e a presença de leucócitos no sêmen. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estabelecer o padrão de concentração e o perfil leucocitário de acordo com qualidade seminal em touros de corte.

## **Material e Métodos**

Foram conduzidos dois experimentos totalizando 439 touros. No primeiro, buscou-se obter um padrão leucocitário em amostras colhidas por vagina artificial de touros com fertilidade superior, pertencentes à centrais de coleta e processamento de sêmen (CCPS). No segundo, objetivou-se avaliar o perfil leucocitário de touros criados de forma extensiva, de acordo com condições usuais de campo.

### *Experimento 1*

Foram avaliados 57 touros dos genótipos taurino (*Bos taurus*, n=29), zebuino (*Bos indicus*, n=10) e sintético (*Bos taurus* X *Bos indicus*, n=18), com idade variando entre três e oito anos. Os animais de genótipo taurino e sintético pertenciam a duas CCPS localizadas no Rio Grande do Sul, nas cidades de Bagé e Dom Pedrito e as coletas ocorreram no período de fevereiro a abril de 2011. Os zebuínos foram coletados em setembro de 2011 em uma central localizada em São Paulo, no município de Sertãozinho.

Os animais foram submetidos à coleta de sêmen com vagina artificial, seguindo os padrões técnicos e de higiene de rotina dos CCPS. O exame físico do sêmen foi realizado no laboratório de cada central. Imediatamente após a coleta avaliou-se turbilhonamento (0 a 5), motilidade (0 a 100%) e vigor (0 a 5) em microscopia de campo claro (100x). Foram feitos esfregaços de sêmen fresco em duplicata de cada touro. Uma lâmina foi corada pela reação de Feulgen de acordo com Fernandes et al. (2008) para avaliação da morfologia espermática, considerando-se o percentual de espermatozóides normais e com defeitos de cabeça, vesículas nucleares, peça intermediária, acrossomo, gota citoplasmática proximal, cauda e cabeça isolada normal, em microscopia de contraste de fase (Olympus BX 45, 1000x). O outro esfregaço foi corado pelo método citológico rápido (solução contendo 0,1% de triarilmetano, xanteno e tizina) para estimar o perfil leucocitário. Para isso, foram considerados os totais de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos em 20 campos avaliados aleatoriamente em microscopia de campo claro (Olympus BX 45, 400x). Para o cálculo da concentração espermática e leucocitária uma amostra do ejaculado foi armazenada na diluição 1:200 em formol-salina tamponada 1%. A concentração espermática foi feita com auxílio da câmara de Neubauer, conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry; Neves, 1998). A concentração leucocitária foi feita por meio da contagem de leucócitos nos quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer. O valor obtido foi aplicado na seguinte fórmula (DACIE; LEWIS, 1995):

$$\text{Leucócitos/mL} = A / (1/200 \times 2/5) \times 1000$$

*Onde:*

*A = número de células contadas nos quatro quadrantes*

*1/200 = diluição do sêmen em formol salina tamponada a 1%*

*2/5 = volume da câmara (mm<sup>3</sup>)*

*1000 = fator de correção para mililitro*

Para a análise estatística, os dados foram transformados ( $\arcsen\sqrt{x}$ ). A comparação entre as variáveis seminais e leucocitárias entre genótipos foi feita pela análise de variância, modelo linear multivariado com a idade dos touros como covariância. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan.

## *Experimento 2*

Foram estudadas amostras de sêmen de 382 touros de corte, dos genótipos zebuino (n=284) e sintético (n=98), com idade entre três e 12 anos, provenientes de propriedades localizadas no estado de Mato Grosso do Sul, mantidos em regime extensivo e utilizados em monta natural. As coletas foram

realizadas entre 30 a 60 dias após o término da estação de monta. Os touros foram submetidos ao exame geral e especial do aparelho reprodutivo e aqueles com alterações clínicas foram retirados do estudo. O sêmen foi coletado por eletroejaculação com exposição do pênis e a primeira fração era descartada. O exame físico do sêmen foi realizado no local, avaliando-se aspecto, turbilhonamento, motilidade e vigor conforme Henry e Neves (1998). Foram feitos esfregaços em duplicata de cada touro que foram corados e avaliados sob os mesmos critérios do experimento 1.

Com base nos dados obtidos, os touros foram classificados quanto à condição reprodutiva em aptos a reprodução (n=316), quando apresentaram no mínimo 50% de motilidade, vigor três e 70% de espermatozoides normais; e inaptos (n= 66), os que apresentaram valores inferiores aos reportados acima. Para a contagem de leucócitos adotou-se a classificação das amostras segundo Sprenger, Coe e Walker (1999) em três categorias: A, B ou C quando os esfregaços continham <1, 1 a 5, e >5 leucócitos por campo, respectivamente.

Todos os touros eram negativos para brucelose e tuberculose, sendo que aqueles com alterações clínicas no aparelho reprodutivo não foram incluídos nas análises.

Para a análise estatística as variáveis seminais, total de leucócitos e leucócitos por campo foram transformadas ( $\arcsen\sqrt{x}$ ). Os dados foram submetidos à análise de variância, modelo linear multivariado para efeito fixo da condição reprodutiva (apto X inapto) e aleatório para genótipo (zebuíno x sintético) e interação entre ambos (condição reprodutiva X genótipo). Para minimizar o efeito da variação de idade, os animais foram classificados em jovens (3 a 5 anos), adultos (5 a 10 anos) e velhos (10 a 12 anos) e essa classificação foi incluída na análise como covariância. A comparação entre as médias foi feita através do teste de Duncan. O percentual de leucócitos sobre a contagem total foi comparado entre a condição reprodutiva e genótipo pelo teste de Mann-Whitney U. O teste do Qui-quadrado de Pearson foi utilizado para comparar a frequência dos touros de acordo com a condição reprodutiva, genótipo e classificação de leucócitos/campo (A, B e C). A análise de regressão logística foi utilizada para estimar a razão de chance (*odds ratio*) de touros inaptos de acordo com as categorias de leucócitos e o genótipo.

## **Resultados**

### *Experimento 1*

As características do espermograma para cada genótipo estudado estão apresentadas na Tabela 1. Houve diferença ( $p<0,05$ ) entre os grupos genéticos para concentração espermática, total de macrófagos e linfócitos. Na morfologia espermática, apenas os defeitos de vesícula nuclear apresentaram percentuais diferentes entre os genótipos. A concentração média de células leucocitárias na espécie bovina foi de  $4,73 \pm 2,6 \times 10^6/\text{mL}$  de sêmen e a média de leucócitos por campo foi de  $0,35 \pm 0,20$ .

Do total de amostras estudadas, 91,2% apresentaram pelo menos um tipo de leucócito, sendo que os neutrófilos foram o tipo celular encontrado com maior frequência nos três genótipos, seguido pelos linfócitos nos zebuínos e taurinos e pelos macrófagos nos touros sintéticos (tabela 1). Não foram observados eosinófilos em nenhuma das amostras.

### *Experimento 2*

A Tabela 2 mostra as médias das características seminais e do perfil leucocitário dos touros aptos e inaptos de acordo com o genótipo. Como esperado, os principais parâmetros de qualidade seminal (motilidade, vigor e morfologia) foram inferiores ( $p < 0,05$ ) nos touros inaptos quando comparados aos aptos. Os touros zebuínos, tanto aptos quanto inaptos, apresentaram maior proporção de defeitos morfológicos que os sintéticos. No perfil leucocitário, os inaptos apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) de neutrófilos, macrófagos e linfócitos em relação aos aptos. Houve variação na contagem de macrófagos de acordo com o genótipo. Os zebuínos apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) aos sintéticos. A contagem de leucócitos por campo foi superior ( $p < 0,05$ ) nos inaptos (Figura 1), sem efeito do genótipo. A maioria dos touros aptos (291/316, 92,0%) apresentaram até 1,0 leucócito/campo.

Os leucócitos ocorreram em 87,0% dos touros, sendo que aptos e inaptos apresentaram prevalências semelhantes ( $p > 0,05$ ): 86,5% e 89,2%, respectivamente. Linfócitos e neutrófilos foram o tipo celular mais frequente entre os leucócitos, sem diferença nos percentuais entre os genótipos e a condição reprodutiva. Os macrófagos apresentaram percentuais baixos nos touros aptos, porém nos touros inaptos, essas células apareceram com frequência semelhante aos neutrófilos e linfócitos (Figura 2).

Nas amostras dos touros inaptos foram observados neutrófilos e macrófagos com morfologia celular alterada que não foram notados nos aptos. Essas formas eram caracterizadas pela presença de grânulos citoplasmáticos com perda do contorno celular e núcleos degenerados. Frequentemente essas células eram encontradas agrupadas. Eosinófilos não foram observados em nenhuma das amostras.

A distribuição da população estudada para cada classificação de leucócitos/campo de acordo com a condição reprodutiva e o genótipo está apresentada na Tabela 3. A análise de regressão logística foi significativa para o diagnóstico reprodutivo e para o genótipo, os resultados e a razão de chance estão demonstrados na tabela 4.

## **Discussão**

Esse estudo demonstrou que os leucócitos estão presentes no ejaculado bovino, independente de sua condição reprodutiva, regime de criação ou método de coleta do sêmen. A prevalência, nos dois experimentos, ficou acima de 85% para todos os grupos estudados.

Os animais do experimento 1 apresentaram características seminais satisfatórias, compatíveis com touros que estão sob coleta frequente de sêmen (BRITO et al., 2002). Não houve diferença entre os genótipos para a qualidade seminal, apenas na concentração espermática os zebuínos apresentaram valores superiores aos taurinos e sintéticos, o que está de acordo com o encontrado por Silva et al. (2009). No segundo experimento, os parâmetros seminais, bem como o índice de descarte de touros (inaptos) também estão de acordo com as médias da região (ANDRADE et al., 2001; SALVADOR et al., 2002; DIAS et al., 2007).

A concentração média de leucócitos no sêmen para touros zebuínos, taurinos e sintéticos, coletados com vagina artificial foi de  $4,7 \times 10^6/\text{mL}$ , com valores variando de 1,2 a  $13,7 \times 10^6/\text{mL}$ . Nos cães, concentrações até  $2,0 \times 10^6/\text{mL}$  são consideradas fisiológicas (KUSTRITZ, 2007; FONTBONNE, 2011) e nos humanos a Organização Mundial da Saúde classifica como leucocitospermia valores acima de  $1,0 \times 10^6/\text{mL}$  (WHO - World Health Organization, 1992). Devido à concentração espermática dos bovinos ser muito superior a essas duas outras espécies, era esperado um valor mais alto também para a concentração leucocitária.

Em touros sob regime extensivo (experimento 2), o percentual de macrófagos foi superior nos inaptos. O aumento de macrófagos nos indivíduos com baixa qualidade seminal pode ser explicado pela retenção de espermatozóides anormais, estimulando a migração das células leucocitárias para fagocitose no lúmen dos ductos extragonadais (TOMLINSON et al., 1992). Sutovsky et al. (2001) demonstraram um mecanismo de controle de qualidade espermática presente no epidídimo de mamíferos, em que os espermatozóides com defeitos morfológicos recebem a marcação em sua superfície de uma proteína conhecida como ubiquitina. Essa proteína, secretada pelo epitélio epididimal, é reconhecida pelas células leucocitárias que fazem a fagocitose da maioria dos espermatozoides marcados. Durante esse processo de fagocitose, os leucócitos produzem uma série de citocinas, entre elas o interferon gama, que ativa e recruta os macrófagos. Macrófagos ativados, por sua vez, produzem fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), aumentando a quimiotaxia de outros leucócitos. (FRIEDL; WEIGELIN, 2008; FEDDER, 1996). Nos touros inaptos, a contagem de macrófagos dos zebuínos foi expressivamente superior aos sintéticos. Essa elevação pode ser devido aos valores superiores de espermatozóides com defeitos morfológicos, como cabeça isolada normal, gota citoplasmática proximal, defeitos de peça intermediária, cauda e acrossomo. Esse fato reforça a hipótese de que o acúmulo de espermatozoides morfológicamente anormais atrai os leucócitos para a luz do túbulo epididimal, especialmente os macrófagos.

Neste estudo, para avaliar a presença de leucócitos no sêmen foi utilizada a técnica de contagem de leucócitos em 20 campos aleatórios. Essa metodologia, já recomendada na rotina das avaliações andrológicas em caninos e ovinos, se mostrou eficiente, prática e acessível também nos bovinos. No primeiro experimento, em que todos os touros eram de fertilidade superior, a quantidade de leucócitos por campo variou de 0,0 a 1,1. No segundo experimento, 92% dos touros aptos apresentaram até 1 leucócito/campo. Deve-se levar em consideração que o método de coleta de sêmen

foi diferente nos dois experimentos. Embora não existam alterações nos parâmetros de qualidade seminal de touros coletados através da ejaculação espontânea e eletroejaculação (AUSTIN; HUPP; MURPHREE, 1961), sabe-se que as amostras provenientes da eletroejaculação, principalmente quanto à concentração espermática, são mais suscetíveis a variações individuais e de fatores como a intensidade e frequência da estimulação (BARTH, 2007). Como, neste estudo, as médias de leucócitos por campo dos touros do experimento 1 e os aptos do experimento 2 foram próximas (0,35 e 0,43, respectivamente), pressupõe-se que método de coleta não interferiu nos resultados.

Em carneiros, a detecção de cinco ou mais leucócitos por campo (400x) é considerado como indicativo de infecção ou inflamação no trato reprodutivo, principalmente epididimite causada pela brucelose ovina (KOTT et al., 1987). Esses autores identificaram mais de 10 leucócitos/campo em 92% dos carneiros infectados com *Brucella ovis*. Mais recentemente, Paolicchi et al. (2000) identificaram mais de 5 leucócitos/campo em 71,4% dos carneiros inoculados com *Brucella ovis*. Cães normais, geralmente apresentam até 6 leucócitos/campo. Quando valores superiores a esse são encontrados, recomenda-se fazer cultura bacteriana do ejaculado (JOHNSON, 2006; KUSTRITZ, 2007; FONTBONNE, 2011). Em bovinos, Sprenger, Coe e Walker (1999) encontraram 75% das amostras com até 1 leucócito/campo. Embora não tenha sido identificada associação entre qualidade seminal e a quantidade de leucócitos no sêmen, os autores recomendam que amostras contendo mais de 5 leucócito/campo sejam encaminhadas para cultura bacteriana, especialmente se houver baixo percentual de espermatozoides normais.

Apesar de não ter sido quantificado nesse estudo, a morfologia de neutrófilos estava alterada em várias amostras dos touros inaptos. Essas alterações citoplasmáticas e nucleares são compatíveis com cariólise e cariorréxis (THOMSON, 1983). Após a transmigração do capilar para o epitélio ou lúmen tubular, os neutrófilos não retornam ao sistema circulatório, eles envelhecem e morrem no tecido. Em circunstâncias normais, o envelhecimento celular é observado como uma hipersegmentação do núcleo, possivelmente em consequência do armazenamento espermático e função fagocítica (CYR et al., 2002). Assim, pode-se supor que não apenas a concentração de leucócitos aumenta nos touros com baixa qualidade seminal, mas também que a atividade fagocítica é mais intensa.

A distribuição da população estudada dentro das classes de leucócitos por campo demonstrou que touros inaptos tendem a ter maior concentração de leucócitos no sêmen. Essa observação foi reforçada pela análise logística que revelou que touros inaptos têm 6,5 vezes mais chances de apresentarem mais de 1 leucócito/campo do que touros aptos. O genótipo do animal também influenciou no modelo, com uma taxa de risco baixa (0,3), porém significativa. Desta forma, a probabilidade de touros zebuínos com classe de leucócitos B serem inaptos é de 37,9%, contra apenas 8,5% nos classe A. Já os touros sintéticos tem uma probabilidade de 24,6% de serem inaptos quando classificados como A e de 68,2% quando classificados como B.



A relação entre os leucócitos e os parâmetros seminais parece ser altamente complexa e envolve uma série de fatores como a capacidade antioxidante do plasma seminal (SHARMA et al., 1999), a produção de citocinas pró-inflamatória (FRACZEK; KURPISZ, 2007) e, principalmente, a de radicais livres (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992). Apesar dos espermatozóides também produzirem ROS, a principal fonte desses radicais no sêmen são os macrófagos e neutrófilos. Esses radicais, quando em contato com a célula espermática, provocam a peroxidação lipídica da membrana plasmática que, além de afetar a estabilidade da membrana, penetram na célula, destruindo o DNA mitocondrial e afetando a produção de ATP intracelular. Assim, há déficit de energia para as atividades espermáticas e a motilidade é reduzida (PENTYALA et al., 2007). Os ROS também podem induzir alterações na regulação da espermatogênese e da compactação da cromatina nuclear, levando à produção de espermatozóides anormais e com danos no DNA (AZIZ et al., 2004; AITKEN; DE IULLIS; MCLACHLAN, 2008). Porém, o plasma seminal dos mamíferos tem um grande número de mecanismos de defesa antioxidantes que permitem que os impactos negativos dos ROS possam ser facilmente reduzidos. Conseqüentemente, o efeito provocado por esses radicais livres depende do balanço entre as atividades oxidante e antioxidante, e apenas terão efeitos negativos, uma vez que exceda um limiar específico (SHARMA et al., 1999; LACKNER et al., 2010). No entanto, a geração de baixos níveis de ROS é necessária para regular a atividade de genes e proteínas vitais para diferenciação e função das células espermáticas (ANDRABI, 2007), assim como para o processo de reação acrossomal e capacitação espermática (FORD, 2004; AITKEN; BENNETTS, 2006). Portanto, fica claro que os leucócitos possuem efeito duplo no sêmen, e suas conseqüências parecem estar relacionadas com a quantidade e o momento que essas células entram em contato com o espermatozóide.

## **Conclusão**

Os leucócitos estão presentes na maioria dos ejaculados bovinos e quando em valores elevados, sua presença pode estar associada à baixa qualidade seminal. A concentração média de células leucocitárias no sêmen bovino é de  $4,7 \times 10^6/\text{mL}$ . A contagem de leucócitos em esfregaço seminal é um método eficiente, prático e acessível. Valores de até 1 leucócito/campo no ejaculado são considerados fisiológicos e quando superiores a cinco estão associados à baixa qualidade seminal e alto risco de inaptidão reprodutiva.

## **Agradecimentos**

Às empresas CRV Lagoa, Androgen e Progen que gentilmente cederam seus animais e instalações para as coletas e análises do sêmen e a FUNDECT/MS pela bolsa de mestrado.

## Referências

- AITKEN, R. J.; BENNETTS, L. Reactive oxygen species: friend or foe. In: DE JONGE C.J.; BARRATT C.L.R. *The sperm cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, New York, 2006. 357p.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; MCLACHLAN, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*, v. 32, p. 46–56, 2008.
- ALVAREZ, J. G.; SHARMA, R. K.; OLLERO, M.; SALEH, R. A.; LOPEZ, M. C.; THOMAS, A. J. Jr.; EVENSON, D. P.; AGARWAL, A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 319–329, 2002.
- ANDRABI, S. M. H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 24, p. 561–569, 2007.
- ANDRADE, V. J.; SALVADOR, D. F.; VALE FILHO, V. R.; QUIRINO, C. R.; RIBEIRO FILHO, A. L.; NOGUEIRA, L. A. G.; DIAS, J. C.; SILVA, A. S.; GATTASS, C. Perfil andrológico de touros da raça Nelore de dois e três anos de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 2, p.182-184, 2001.
- ARATA DE BELLABARBA, G.; TORTOLERO, I.; VILLARROEL, V.; MOLINA, C. Z.; BELLABARBA, C.; VELASQUEZ, E. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Archives of Andrology*, v. 45, p. 131–136, 2000.
- AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R. L. Comparison of Quality of Bull Semen Collected in the Artificial Vagina and by Electroejaculation. *Journal of Dairy Science*, v. 44, n. 12, p. 2292–2297, 1961.
- AZIZ, N.; AGARWAL, A.; LEWIS-JONES, I.; SHARMA, R. K.; THOMAS, A. J. Novel association between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertility and Sterility*, v. 82, n. 3, p. 621-627, 2004.
- BARRATT, C. L.; BOLTON, A. E.; COOKE, I. D. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, v. 5, p. 639–648, 1990.
- BARTH, A. D. Evaluation of potential breeding soundness of the bull. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFAL, W. R. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2*. Saunders Elsevier, 2 ed. St. Louis, USA, 2007. 1061p.
- BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A. G.; KASTELIC, J. P. Effects of enviromental factors, age and genotype on sperm production and sêmen

quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science*, v. 70, p. 181-190, 2002.

CYR, D. G.; FINNISON, K.; DUFRESNE, J.; GREGORY, M. Cellular Interactions and the Blood-Epididymal Barrier. In: ROBARAIRE, B.; HINTON, B. T. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Kluwer Academic Publishers, New York, 2002. p. 103-18.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. *Practical Haematology*. 8th. Churchill Livingstone, London, 1995.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-378, 1992.

DEL GIGLIO, A.; KALIKS, R. *Princípios de hematologia clínica*. 1 ed. Manole, Barueri, 2006. 300p.

DIAS, J. C.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R.; PEREIRA, J. C. C. Caracterização andrológica de touros Nelore criados extensivamente em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Veterinária Notícias*, v. 13, p. 39-46, 2007.

FEDDER, J. Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. *Archives of Andrology*, v. 36, p. 41-65, 1996.

FERNANDES, C. E.; MORAES, J. C. F. Avaliação Clínica e Exame de Sêmen no Touro. In: AMARAL, T. B.; SERENO, J. R. B.; PELLEGRIN, A. O. *Fertilidade, Funcionalidade e Genética de Touros Zebuínos*. 1 ed. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2009.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v. 70, p. 1560-1568, 2008.

FONTBONNE, A. Infertility in male dogs: recent advances. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 266-273, 2011.

FORD, W. C. L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, v. 10, n. 5, p. 387-399, 2004.

FRACZEK, M.; KURPISZ, M. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 28 n. 2, p. 325-333, 2007.

FRIEDL, P.; WEIGELIN, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature Immunology*, v. 9, n. 9, p. 960-69, 2008.

HENRY, M.; NEVES, J. P. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 1998. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte. 49p.

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. 1 ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993. 417p.

- JOHNSON, C. Current concepts on infertility in the dog. *Waltham Focus*, v. 16, n. 2, p. 7-12, 2006.
- KALELI, S.; ÖÇER, F.; IREZ, T.; BUDAK, E.; AKSU, M. F. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 89, p. 185–191, 2000.
- KENNEDY, S. P.; SPITZER, J. C.; HOPKINS, F. M.; HIGDON, H. L.; BRIDGES, W. C. Jr. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriogenology*, v. 58, p. 947-961, 2002.
- KIESSLING, A. A.; LAMPARELLI, N.; YIN, H. Z.; SEIBEL, M. M.; EYRE, R. C. Semen leukocytes: friends or foes? *Fertility and Sterility*, v. 64, p. 196–198, 1995.
- KOTT, R. W.; HALVER, G. C.; FIREHAMMER, B.; THOMAS, V.M. Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology*, v. 29, p. 961-970, 1988.
- KUSTRITZ, R. M. V. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, v. 68, p. 329–337, 2007.
- LACKNER, J. E.; AGARWAL, A.; MAHFOUZ, R.; DU PLESSIS, S. S.; SCHATZL, G. The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 8, p.12, 2010.
- MCENTEE K. *Reproductive pathology of domestic animals*. Academic Press, San Diego, 1990. 401p.
- PAOLICCHI, F. A.; CASAROB, P. A.; GIMENOC, E. J.; KORTEBANID, L. G.; MAZZOLLID, A. B. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, v. 36, p. 7-15, 2000.
- PENTYALA, S.; LEE, J.; ANNAM, S.; ALVAREZ, J.; VEERRAJU, A.; YADLAPALLI, N.; KHAN, S. A. Current perspectives on pyospermia: a review. *Asian Journal of Andrology*, v. 9, p. 593–600, 2007.
- RICCI, G.; PERTICARARI, S.; FRAGONAS, E.; GIOLO, E.; CANOVA, S.; POZZOBON, C.; GUASCHINO, S.; PRESANI, G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human Reproduction*, v. 17, n. 10, p. 2665–2672, 2002.
- RODIN, D. M.; LARONE, D.; GOLDSTEIN, M. Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertility and Sterility*, v. 79, p. 1555–1558, 2003.
- SALVADOR, D. F.; DIAS, J. C.; VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; SILVA, A. S.; NOGUEIRA, E. Perfil andrológico de touros da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados

extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 2, p. 64-67, 2002.

SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J. JR.; AGARWAL, A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction*, v. 14, p. 2801–2807, 1999.

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

SPRENCER, D. J.; COE, P. H.; WALKER, R. D. Relationships among seminal culture, seminal white blood cells, and the percentage of primary sperm abnormalities in bulls evaluated prior to the breeding season. *Theriogenology*, v. 51, p. 1197-1206, 1999.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; THOMPSON, W. E.; SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science*, v. 75, p. 114-165, 2001.

THOMAS, J.; FISHEL, S. B.; HALL, J. A.; GREEN, S.; NEWTON, T. A.; THORNTON, S. J. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Human Reproduction*, v. 12, p. 2418-2421, 1997.

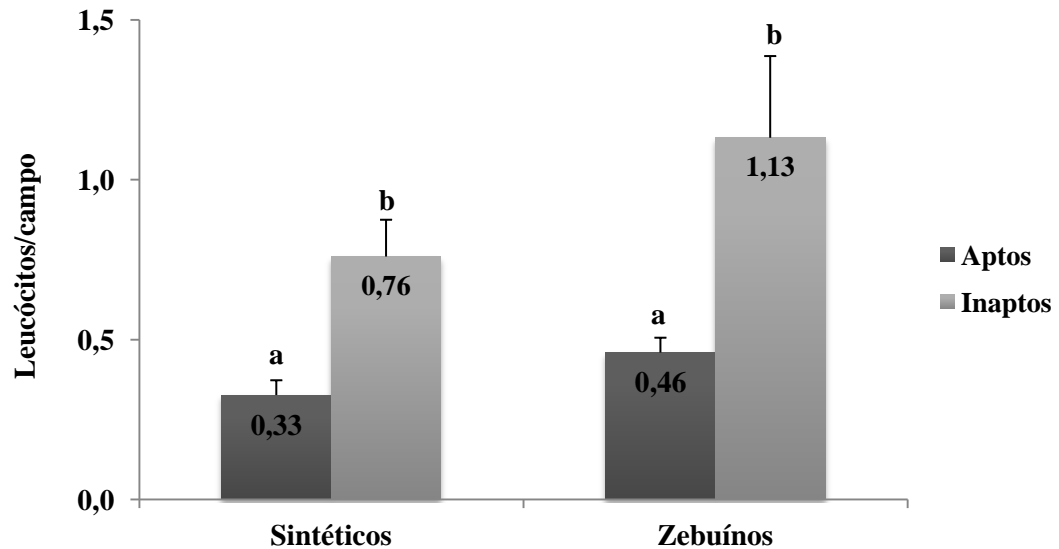
THOMSON, R. G. *Patologia Geral Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1983. 412p

TOMLINSON, M. J.; WHITE, A.; BARRATT, C. L.; BOLTON, A. E.; COOKE, I. D. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Human Reproduction*, v. 7, p. 517–522, 1992.

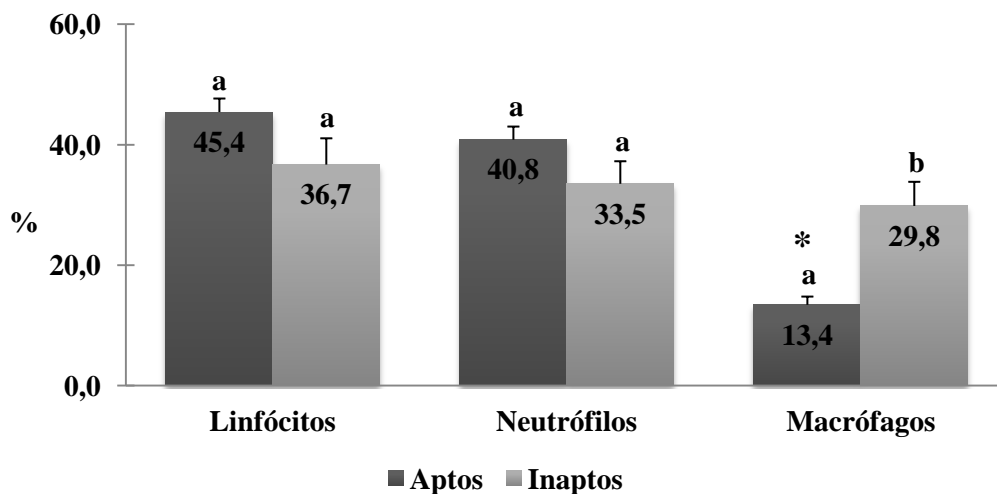
World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

## Figuras

**Figura 1.** Número de Leucócitos por campo de microscopia (400x;  $\pm$ epm) de touros sintéticos e zebuínos de acordo com a condição reprodutiva (Letras distintas entre colunas representam diferença entre condição reprodutiva  $p < 0,01$ ; epm, erro padrão da média).



**Figura 2.** Percentual médio ( $\pm$ epm) de células leucocitárias no sêmen de touros de corte de acordo com a condição reprodutiva (Letras distintas entre colunas representam diferença entre condição reprodutiva,  $p < 0,05$ ; \*diferença entre o tipo celular para cada condição reprodutiva,  $p < 0,05$ ; epm, erro padrão da média).



## Tabelas

**Tabela 1.** Médias ( $\pm$ epm) das características seminais, concentração e perfil leucocitário seminal de touros pertencentes a centrais de coleta e processamento de sêmen.

Características seminais	Zebuínos (n=18)	Taurinos (n=10)	Sintético (n=29)	Média Geral
Concentração Espermática ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	1385,0 $\pm$ 245,77 <sup>a</sup>	700,2 $\pm$ 66,45 <sup>b</sup>	751,9 $\pm$ 93,68 <sup>b</sup>	836,6 $\pm$ 69,42
Motilidade (%)	67,0 $\pm$ 3,41	66,3 $\pm$ 2,01	62,7 $\pm$ 3,12	65,3 $\pm$ 1,54
Vigor (1-5)	3,3 $\pm$ 0,21	2,9 $\pm$ 0,25	3,1 $\pm$ 0,22	3,0 $\pm$ 0,15
Morfologia (%)				
Normais	82,6 $\pm$ 1,48	79,1 $\pm$ 1,60	84,1 $\pm$ 1,51	81,3 $\pm$ 1,01
Defeito de cabeça	6,5 $\pm$ 0,62	6,4 $\pm$ 0,70	5,9 $\pm$ 0,99	6,3 $\pm$ 0,48
Vesícula nuclear	1,4 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	0,2 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	0,6 $\pm$ 0,13
Defeito de peça intermediária	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,11	0,2 $\pm$ 0,10	0,2 $\pm$ 0,06
Defeito de acrossomo	1,9 $\pm$ 0,58	1,5 $\pm$ 0,39	0,7 $\pm$ 0,33	1,4 $\pm$ 0,25
Gota citoplasmática proximal	0,1 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,07	0,0 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,03
Defeito de cauda	5,9 $\pm$ 1,03	9,1 $\pm$ 0,96	5,9 $\pm$ 0,95	7,5 $\pm$ 0,63
Cabeça isolada normal	1,6 $\pm$ 0,34	2,7 $\pm$ 0,68	2,9 $\pm$ 0,54	2,6 $\pm$ 0,39
Concentração Leucocitária ( $\times 10^6/\text{mL}$ )				
Leucócitos/Campo	0,3 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,03
Neutrófilos	1,7 $\pm$ 0,57	3,0 $\pm$ 0,61	3,0 $\pm$ 0,87	2,8 $\pm$ 0,42
Macrófagos	0,2 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	1,5 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,24
Linfócitos	1,7 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,20

Epm, erro padrão da média. Letras distintas entre colunas representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre genótipos.

**Tabela 2.** Médias ( $\pm$ epm) de diferentes características seminais e perímetro escrotal de acordo com a condição reprodutiva em touros de corte no Mato Grosso do Sul.

Características seminais	Aptos (n=316)		Inaptos (n=66)	
	Sintéticos (n=67)	Zebuínos (n=249)	Sintéticos (n=30)	Zebuínos (n=36)
Motilidade (%)	65,0 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>	66,3 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	46,3 $\pm$ 3,72 <sup>b</sup>	41,3 $\pm$ 3,74 <sup>b</sup>
Vigor (1-5)	3,2 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	3,2 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	2,7 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>
Morfologia (%)				
Normais	81,3 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	74,6 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>	58,5 $\pm$ 3,18 <sup>c</sup>	47,5 $\pm$ 2,58 <sup>d</sup>
Defeito de cabeça	6,0 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	14,1 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>	10,4 $\pm$ 1,19 <sup>c</sup>
Vesícula nuclear	4,2 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	13,8 $\pm$ 2,99 <sup>c</sup>	3,8 $\pm$ 1,60 <sup>ab</sup>
Defeito de peça intermediária	0,8 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	2,0 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 1,00 <sup>c</sup>
Defeito de acrossomo	0,5 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	3,3 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	0,0 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 1,21 <sup>b</sup>
Gota citoplasmática proximal	0,3 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	6,4 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>
Defeito de cauda	3,1 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 0,31 <sup>bc</sup>	5,4 $\pm$ 1,18 <sup>ab</sup>	8,1 $\pm$ 1,39 <sup>c</sup>
Cabeça isolada normal	3,3 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	16,1 $\pm$ 2,74 <sup>c</sup>
Leucócitos/campo	0,3 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
Neutrófilos	2,4 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	4,9 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>	5,8 $\pm$ 1,38 <sup>bc</sup>	6,0 $\pm$ 1,25 <sup>c</sup>
Macrófagos	0,8 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	4,3 $\pm$ 0,74 <sup>c</sup>	9,5 $\pm$ 4,90 <sup>d</sup>
Linfócitos	3,2 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	7,0 $\pm$ 1,55 <sup>b</sup>

Epm, erro padrão da média; letras distintas entre colunas representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre condição reprodutiva.

**Tabela 3.** Frequência de cada classificação para leucócitos/campo de acordo com a condição reprodutiva e genótipo em touros de corte.

Classificação Leucócitos/campo	Condição Reprodutiva*			
	Aptos n(%)		Inaptos n(%)	
	Sintéticos	Zebuínos	Sintéticos	Zebuínos
A (0,0 - 1,0)	63 (94,0)	226 (90,8)	20 (66,7)	22 (61,1)
B (1,1 - 5,0)	4 (6,0)	23 (9,2)	10 (33,3)	12 (33,3)
C (> 5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (5,6)

\* $p < 0,005$  para efeito da condição reprodutiva.



**Tabela 4.** Estimativa da razão de chance (*odds ratio*)\* para touros inaptos de acordo com as categorias de leucócitos e o genótipo.

	Coeficiente	EP	Z	p-valor	RC	IC 95%
Classificação Leucócito/campo	1,8786	0,3291	5,7076	<0,0001	6,5442	3,43 – 12,47
Genótipo	-1,2556	0,3043	-4,1263	<0,0001	0,2849	0,16 – 0,52

\*Análise de regressão logística; EP, erro padrão; RC, razão de chance; IC, Intervalo de confiança.

[LogitPi = -1,7405 + (1,8786 X<sub>1</sub>) - (1,256 X<sub>2</sub>)];  $\chi^2 = 48,44$ ; GL = 2; p<0,000.