

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM TOUROS

VIVIANE CONDE FERNANDES

PORTO ALEGRE

2012/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA EM TOUROS

Autora: Viviane Conde Fernandes

**Monografia apresentada como
requisito parcial para graduação
em Medicina Veterinária**

**Orientadora: Ender Rosana
Oberst**

Co-orientadora: Carla Lehugehur

PORTO ALEGRE

2012/2

AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre uma tarefa difícil, mas deveria ser mais frequente.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta jornada seja com apoio, com uma palavra amiga, com um material de estudo, com a compreensão nos dias, semanas, meses, enfim, 7 anos que eu repeti a tão famosa frase: “Não posso, tenho prova/trabalho/estágio/plantão”.

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Jorge e Marli, que me deram não só base financeira pra realizar cursos, estágios em diversos lugares, congressos, palestras, mas também me deram todo o apoio emocional em todos os momentos difíceis destes anos, que não foram poucos. Assim como aos meus irmãos Rafael e Ana Carolina. Nós não somos um exemplo de família para comercial de margarina, mas sem dúvida nenhuma somos loucos uns pelos outros e, se tivesse que escolher, eu escolheria vocês.

Aos meus amigos, os de longe, os de perto, os velhos e os novos, o meu muito obrigada pela compreensão, pela amizade, pela alegria de poder compartilhar tantos momentos maravilhosos com vocês. É impossível citar todas as pessoas que fizeram parte disso sem esquecer ninguém, mas impossível não vir três pessoas à cabeça quando se menciona a palavra AMIZADE. Vanessa Nicolini, Carolina Nievesberg e Ana Paula Merlo, vocês são as melhores pessoas que eu poderia conhecer, as melhores amigas que eu poderia querer, já não posso chamar vocês só de amigas, já que pra mim são mais que isso, são irmãs.

À Faculdade de Veterinária – UFRGS que me acolheu, e a todos os professores da casa que, em algum momento, me abriram as portas. Entre eles o cara com fama de “grosso” e “ranzinza”, e de coração gigante, que me recebeu em 2007 e desde lá me deu grandes lições de clínica e reprodução de bovinos e grandes lições de vida e de como me tornar melhor como pessoa e como profissional, Professor Jorge Bangel.

Às minhas orientadora e co-orientadora deste trabalho, Ender Oberst e Carla Lehugeur, pela compreensão, paciência e auxílio durante o TCC, o maior pesadelo dos formandos. Ainda a professora Ender pelos ensinamentos durante a monitoria na disciplina de Inseminação Artificial, pela indicação pro estágio curricular e por todos os momentos de ajuda e compreensão, acredito não ser à toa que todos alunos da faculdade de veterinária tenham um carinho especial por ela.

Agradeço à minha turma, ATMV 2013/1, cheia de agregados, a ponto de ouvirmos de muitos que não temos identidade. Nós não temos um ano de ingresso igual, mas temos muitas coisas em comum, que foram compartilhadas, principalmente na sala 10. Temos o gosto pelo

mate - amigo das aulas chatas - temos a carona ou a companhia para o RU, temos os churrascos regados a risadas, temos os estudos em conjunto, temos o fato de sermos, muitas vezes, a segunda família uns para os outros. Temos o riso e o choro fáceis. Temos um carinho imenso uns pelos outros, temos a amizade, que, sem dúvida, não acabará dia 27.7.2013, quando realizarmos o sonho de sermos Médicos Veterinários.

Por fim, agradeço à minha sobrinha, afilhada, amor maior, Maria Laura, pela companhia, pelo afeto, pelo carinho imenso que ela tem por mim, e que é recíproco. Agradeço a ela, pois muitas vezes eu tive vontade de desistir, e quando olhava pro lado e via aquele rostinho com um sorriso dizendo: Eu vou ser veterinária igual à Dinda! Eu tinha muito mais força pra continuar. Por todas as vezes que eu tinha que estudar para alguma matéria maçante e ela deitava ao meu lado e pedia pra eu ler as pilhas de polígrafos, resumos e livros pra ela, e dormia. Por todas as vezes que eu cheguei em casa depois de uma prova, de um dia difícil ou cansativo e fui recebida com aquele sorriso e aquele abraço. Por todas as vezes que ela vestiu as luvas pra me ajudar no tratamento de algum cachorro, gato ou vaca, mesmo sabendo que todo seu amor é pelos cavalos. Minha pequena, servir de exemplo pra ti me dá vontade de ir cada vez mais longe.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coloração de Karras Modificada por Papa <i>et al.</i> (1988) e microscopia de contraste de fase	16
Figura 2 - Espermatozóides com defeito Knobbed	23
Figura 3 - Defeitos de Acrossoma: “ <i>Ruffled</i> ” e Incompleto	24
Figura 4 - Defeitos de Acrossoma: NAR, MAR, DAR e LAC	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Padrão seminal para seleção de reprodutores para monta natural	14
Tabela 2 -	Padrões mínimos para sêmen congelado	14
Tabela 3 -	Defeitos Primários e Secundários segundo Blom (1950)	19
Tabela 4 -	Defeitos Maiores e Menores, segundo Blom (1973)	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASMA	Análise Computadorizada da Morfometria Espermática
DAR	Defective Apical Ridge
DIC	Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
LAC	Loose Acrossomal Cap
MAR	Missing Acrossomal Cap
NAAB	National Association of Artificial Breeders
NAR	Normal Apical Ridge

RESUMO

A inseminação artificial é a mais antiga e mais difundida biotecnologia utilizada para a reprodução animal. O desempenho reprodutivo do macho é uma das principais ferramentas para o sucesso da inseminação, assim como da taxa de concepção, em propriedades que utilizam a monta natural. Assim, a avaliação geral do reprodutor, juntamente com a avaliação de sêmen torna-se uma importante ferramenta de controle. Diversos são os testes utilizados para avaliar a qualidade de um ejaculado, porém a morfologia espermática é um importante indicador, desde que correlacionada à avaliação de outros parâmetros, como motilidade e vigor espermático e exame clínico do reprodutor.

O presente trabalho faz uma revisão sobre a importância da morfologia espermática, analisando rapidamente os principais tipos de defeitos e sua repercussão no desempenho reprodutivo de bovinos. Discorre ainda sobre as principais classificações dos defeitos espermáticos e de técnicas de rotina para a avaliação da morfologia espermática.

ABSTRACT

Artificial insemination is the oldest and most widely used biotechnology to animal breeding. The reproductive performance of male is one of the main tools for successful insemination, as well as the conception rate in farms using natural breeding. Thus, the overall assessment the breeder, along with the evaluation of semen becomes an important tool of control. Many tests are used to assess the quality of an ejaculate, but sperm morphology is an important indicator, since it correlated with the evaluation of other parameters, such as motility and sperm vigor and clinical examination of the player.

This paper reviews the importance of sperm morphology, quickly analyzing the major types of defects and their impact on reproductive performance of cattle. Still talks about the main classifications of sperm defects and routine techniques for the evaluation of sperm morphology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	AVALIAÇÃO DE SÊMEN	13
2.1	Métodos de Colheita	15
3	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	16
3.1	Classificação dos Defeitos	18
3.1.1	Defeitos Primários e Secundários	19
3.1.2	Defeitos Maiores e Menores	20
3.1.3	Defeitos Compensáveis e Não Compensáveis	21
3.2	Defeitos Genéticos	21
3.3	Principais Defeitos de acordo com a localização no Espermatozóide	22
3.3.1	Cabeça	22
3.3.1.1	Acrossomo	22
3.3.1.2	Núcleo	25
3.3.2	Colo	26
3.3.3	Cauda	26
3.3.3.1	Defeitos da cauda	27
3.3.3.2	Defeitos da Peça intermediária	27
4	CONCLUSÃO	29
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

O termo Inseminação Artificial significa a deposição de espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea por meios artificiais, sem o envolvimento natural do macho. Existe uma lenda que acredita que tal procedimento teve início em 1332, quando os árabes teriam coletado o sêmen de um garanhão de uma tribo rival depositado no genital de uma égua em estro. Em 1780, o italiano Lazzaro Spallanzani relatou a fecundação de uma fêmea sem o contato direto com o macho quando coletou sêmen de um reprodutor e o depositou no trato genital de uma cadela em estro, que veio a parir 62 dias depois. (MIES FILHO, 1978; FOOTE, 2002)

Ivanovich Ivanov, um dos principais responsáveis pela aplicação prática da inseminação artificial, suas pesquisas iniciaram em 1899, e em 1907, na Rússia, teria estudado a inseminação artificial em diversas espécies como cães, raposas, coelhos e aves. Em equinos, desenvolveu diluidores de sêmen e técnicas para selecionar garanhões superiores e multiplicar sua descendência através da inseminação artificial. Este trabalho foi retomado por Milovanov em 1938, que projetou vaginas artificiais e outros itens semelhantes aos utilizados hoje em dia, sendo um grande avanço em relação ao método de coleta anteriormente utilizado – esponjas colocadas na vagina das vacas. Após o feito de Ivanov, em 1922, notícias da utilização da inseminação artificial tornaram-se comuns (MIES FILHO, 1978; FOOTE, 2002). Na Dinamarca foi desenvolvido o método de fixação retrovaginal da cérvix, permitindo a deposição do sêmen profundamente no colo do útero, o que diminuiu a quantidade de espermatozóides necessária para cada dose inseminante. Na década de 1949 foram criadas cooperativas de inseminação artificial e surgiu a palheta para envasar sêmen – desenvolvida por Sorensen. Posteriormente, em 1964, Cassou passou a produzir as palhetas comercialmente, que atualmente são utilizadas em praticamente todo o mundo. Estes fatos, juntamente com a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol, a técnica passou a ser mais difundida (MIES FILHO, 1978; FOOTE, 2002).

Os métodos e os critérios de avaliação de sêmen e de reprodutores foram estabelecidos com suporte de veterinários da Escandinávia, Nils Lagerlöf e Erick Blom, em 1950. (BARTH e OKO, 1989)

Nos últimos 60 anos, as biotecnologias da reprodução têm mostrado uma grande capacidade de adaptação, transferindo tecnologia entre o laboratório e o campo. A inseminação artificial, assim como a transferência de embriões e a fertilização *in vitro*, além de se mostrarem economicamente viáveis para atingir os objetivos da produção, têm mostrado eficiência no

desenvolvimento sustentável, a fim de manter a biodiversidade e a conservação de espécies ameaçadas de extinção (THIBIER, 2005).

Na bovinocultura, os touros a serem coletados para inseminação artificial ou para serem utilizados na monta natural devem ser submetidos a um exame clínico geral, a fim de identificar alterações clínicas relevantes que possam interferir na função reprodutiva ou nas condições sanitárias, observando-se a conformação geral e estado nutricional dos animais, idade, olhos, dentição, presença de lesões na cabeça, conformação do aparelho locomotor, simetria das articulações, da musculatura e dos cascos, e o exame de outros sistemas e exames complementares, havendo necessidade. Além dos exames gerais, os reprodutores devem ser submetidos a um exame clínico voltado ao aparelho reprodutivo, dividido em exame externo (físico) e interno.

O exame externo consiste na avaliação da integridade dos órgãos reprodutivos - pênis, prepúcio e bainha prepucial, plexo pampiniforme (cordão espermático), saco escrotal, testículos e epidídimos. Já o interno é a avaliação das ampolas dos ductos deferentes e vesículas seminais por palpação retal, e o exame de sêmen. O exame de sêmen, juntamente com a avaliação clínica fornece muitas informações a respeito do reprodutor, assim a motilidade, concentração e morfologia espermática devem estar presentes na avaliação dos mesmos, juntamente da anamnese e exame clínico (KJAESTAD *et al*, 1993; FERNANDES e MORAES, 2009).

Vários autores (FRENEAU *et al*, 2000; SAACKE *et al*, 2000; OSTERMEIER *et al*, 2001): consideram a morfologia espermática, juntamente com a porcentagem de acrossomas intactos, um importante indicador de fertilidade de reprodutores (BARTH e OKO, 1989).

O presente trabalho faz uma revisão sobre a importância da morfologia espermática, analisando rapidamente os principais tipos de defeitos e sua repercussão no desempenho reprodutivo de bovinos.

2 AVALIAÇÃO DE SÊMEN

A avaliação de apenas uma característica do sêmen não garante que as outras venham a ser normais, portanto indica-se uma análise multifatorial para fins de diagnóstico da funcionalidade e estrutura do espermatozóide (LARSSON e RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000; PARKINSON, 2004). Além disso, métodos de avaliação de sêmen bovino em laboratório podem prever sua fertilidade, comprovada pelo não retorno ao estro das vacas inseminadas (LINFORD et al, 1976). O padrão de qualidade do sêmen baseia-se na proporção de células móveis (motilidade e vigor espermático) e morfologia espermática – percentual de espermatozóides normais (RAO et al, 1980).

A morfologia espermática foi uma das primeiras técnicas a serem utilizadas na avaliação seminal. A motilidade e a produção espermática (concentração e volume) estão relacionadas com a morfologia, podendo indicar até que ponto a motilidade e a produção espermática estão dentro dos padrões fisiológicos (BARTH e OKO, 1989).

As variações nestes padrões podem ser associadas a diversos fatores – nutrição, raça, fármacos, sanidade ou manejo -, sendo assim, as alterações podem ser transitórias ou permanentes. Poderá ocorrer redução da qualidade seminal, ou apenas pequenas variações, sendo necessário a realização de avaliações continuadas para um melhor esclarecimento do quadro. Em touros em repouso sexual, por exemplo, pode haver presença de espermatozóides velhos na cauda do epidídimo, e ocorrerá redução de motilidade e vigor e aumento na prevalência de defeitos de cauda ou cabeça isolada normal, havendo melhora no quadro após a coleta de um ou dois ejaculados. Portanto, deve-se levar em conta diversos fatores no exame andrológico, considerando também que cada ejaculado representa uma ínfima fração das reservas gonadais e extragonadais de espermatozóides do reprodutor (FERNANDES e MORAES, 2009).

Nas Tabelas 1 e 2 estão demonstrados os valores, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, para aprovação de machos de diferentes espécies para monta natural e para julgamento de sêmen congelado, respectivamente.

Tabela 1- Padrão seminal para seleção de reprodutores para monta natural

Espécie	Bovino	Caprino	Ovino	Equino	Suíno
Motilidade	70%	70%	70%	70%	70%
Vigor	3	3	3	3	3
Morfologia: %					
sptz anormais	30%	20%	20%	30%	20%

Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª ed., 1998.

Tabela 2- Padrões mínimos para sêmen congelado

Espécie	Bovino	Equino	Caprino	Ovino	Suíno
Volume da Dose	0,25 ml		0,25 ml	0,15 ml	
Motilidade	30%	30%	30%	30%	20%
Vigor	3	3	2	3	
Porcentagem de Defeitos Totais (Máximo)	30%*				
	20%**	40%	20%	20%	
Porcentagem de Defeitos Maiores (Máximo)		20%	10%	10%	50%
Espermatozóides com motilidade progressiva no ato da inseminação		200x10 ⁶	40x10 ⁶	40x10 ⁶	5x10 ⁹

* para doses com 10x10⁶ de espermatozóides com motilidade progressiva

** para doses com 6x10⁶ a < 10x10⁶ de espermatozóides com motilidade progressiva

Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª ed., 1998.

2.1 Métodos de colheita

A vagina artificial é o método mais representativo do ejaculado e é utilizado na grande parte dos animais coletados nas centrais de reprodução, sendo indicado como método de escolha pelo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução (1998), por ser o método considerado mais natural e que garante assim uma melhor qualidade de sêmen. Nem sempre é possível utilizá-lo devido ao comportamento agressivo de alguns touros e por ser necessário um treinamento prévio do animal que não está acostumado a esta prática (BARTH, 2007; FERNANDES e MORAES, 2009; MENEGASSI, 2010).

Assim, o eletroejaculador se torna uma importante ferramenta na coleta de sêmen, devido a sua facilidade de manuseio, segurança e rapidez, mas este método pode ser considerado um estímulo estressor para os bovinos. Outra desvantagem da coleta por eletroejaculação é o fato de que a mesma pode apresentar, principalmente em bovinos, ejaculados com maior volume e menor concentração, porém sem alteração de outras características espermáticas (BARTH, 2007; FERNANDES e MORAES, 2009; MENEGASSI, 2010).

Outro método que pode ser utilizado é a massagem das ampolas e vesículas seminais, através da palpação retal, mas pode resultar em amostras insatisfatórias e induzir lesões vesiculares, irritação da mucosa do reto, incompleta protusão do pênis, além de ser um método cansativo para quem realiza a massagem, limitando o número de animais a serem coletados. Não é recomendado este tipo de coleta para todos os indivíduos, sendo os dois primeiros métodos os mais indicados (BARTH, 2007; FERNANDES e MORAES, 2009; MENEGASSI, 2010).

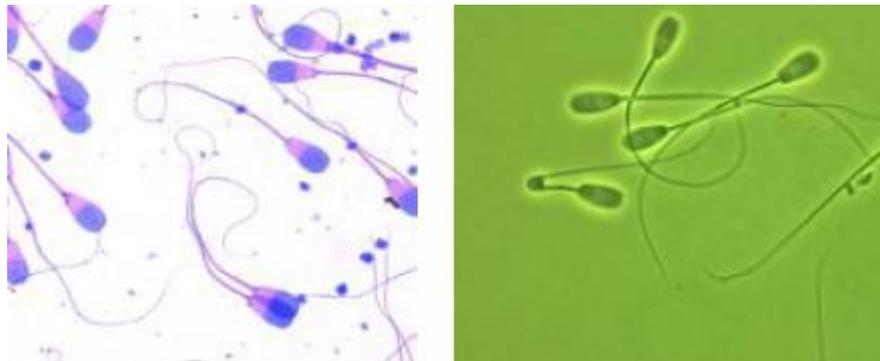
Para fins de congelamento de sêmen, utiliza-se preferencialmente a vagina artificial, por proporcionar amostras mais próximas do que seria o ejaculado no trato reprodutor da fêmea, com uma concentração maior que nos outros métodos citados, resultando em um maior número de doses por ejaculado. A eletroejaculação é amplamente utilizada para colheita de touros de campo e também pode ser utilizada para congelamento. Indica-se que o método de colheita seja indicado no laudo do exame andrológico (FERNANDES e MORAES, 2009)

3 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Para a avaliação de rotina das características morfológicas dos espermatozoides, podem ser utilizadas duas técnicas: esfregaço corado em microscópio de campo claro e preparação úmida com microscópio de contraste de fase (FRENEAU, 2011). Os esfregaços corados podem ser preparados com diferentes corantes, como: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros – o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal sugere que sejam utilizados os métodos de Williams e Cerovsky.

O método de lâmina corada é o mais utilizado, devendo-se tomar alguns cuidados na sua preparação – como garantir esfregaços delgados, realizados com o auxílio de outra lâmina com inclinação de 45°. Na técnica de câmara úmida, os espermatozoides não são corados, é colocada uma gota de sêmen, imerso em solução tamponada, entre lâmina e lamínula, devendo ser utilizada microscopia que seja capaz de evidenciar os contornos celulares, como a microscopia de contraste de fases ou a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) . (CBRA, 1998; MENEGASSI, 2010) (Figura 1)

Figura 1 - Avaliação da morfológica de espermatozoides bovinos. Esquerda: coloração de Karras Modificada por Papa *et al.* (1988). Direita: microscopia de contraste de fase evidenciando diversos defeitos espermáticos



Fonte: Adaptado de Freitas-Dell'Aqua *et al.*, 2009)

Freneau (2010) comparou a morfologia espermática dos ejaculados dos mesmos touros com as duas técnicas, foram verificadas diferenças significativas entre os defeitos maiores e menores, mas não sobre os totais. Defeitos de forma de cabeça não apresentaram diferenças, porém nos individuais foram detectados com maior frequência defeitos de acrossoma, crateras, *pouch formation*, vacúolos e gotas citoplasmáticas, na preparação úmida. As lâminas coradas apresentaram, com maior frequência, defeitos de cauda, cabeça decapitada normal e

defeitos de peça intermediária – dobrada, quebrada, saca-rolha ou zigue-zague. Assim, o autor recomenda-se preferencialmente a preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou de contraste diferencial de interferência de fase, que apresentam maior sensibilidade para defeitos de acrossoma, vacúolos e gotas e devido aos artefatos de técnica que acabam por aumentar defeitos de cauda, peça intermediária e cabeça isolada no esfregaço corado.

Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), é recomendado, para ejaculados de touros: mínimo de 70% de espermatozoides normais, sendo considerada a característica isolada com mais importância para a fertilidade; máximo de 20% de defeitos maiores; máximo de 30% de defeitos menores; limite para anomalias individuais em torno de 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores. Deve haver maior rigor em defeitos espermáticos que possam ter origem genética. Deve ser realizada a observação de 200 células, contando-se apenas um defeito por célula anormal, e se forem observadas duas ou mais alterações na mesma célula, deverá ser registrado o defeito Maior, se observados dois defeitos de mesma classificação, deverá registrar-se o que foi observado com maior frequência.

As anomalias morfológicas podem se expressar por alterações em escalas nanométricas, que não são possíveis de ser observados na microscopia de contraste de interferência diferencial, sendo necessário o emprego de métodos mais objetivos, como a análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA). Este sistema, que é programado para classificar e diferenciar as células espermáticas através da medição de vários parâmetros – diâmetro máximo, mínimo, área da cabeça, porcentagem do acrossomo – classifica as células em normal, macro, micro, afilada ou irregular. Pode apresentar variações nos resultados devido a diversos fatores de preparação, assim como fatores relacionados a análise, até a interpretação do profissional (SAACKE *et al.*, 2001; ARRUDA, 2011).

Sondas fluorescentes também tem sido utilizadas, em microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, sendo útil para a avaliação da integridade de membrana do espermatozoide e do acrossomo, integridade do flagelo, potencial mitocondrial, fragmentação do DNA. A associação de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes permite análise mais ampla da qualidade do sêmen, considerando fatores bioquímicos, estruturais e funcionais (ARRUDA *et al.*, 2003, 2010; GARDES *et al.*, 2010). Entretanto é possível uma fácil visualização e repetibilidade dos resultados em sêmen fresco, para amostras criopreservadas é necessária uma adaptação dos protocolos comumente utilizados,

que nem sempre são suficientes para manter o padrão de emissão de fluorescência (CELEGHINI *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008)

Mais recentemente, a ubiquitina tem sido associada a identificação de espermatozoides com defeitos. A ubiquitina, um pequeno peptídeo de 8,5 kDa, é um marcador universal para proteólise encontrado em todos os tecidos e organismos. Em humanos, bovinos e equinos foi verificado que durante a passagem do espermatozóide pelo epidídimo, o epitélio secreta ubiquitina e/ou proteínas semelhantes, que se ligam à superfície dos espermatozoides com defeitos. A maioria dos espermatozoides ubiquitinizados é subsequentemente fagocitada pelas células epiteliais do epidídimo, antes de atingirem a cauda do epidídimo, mas alguns escapam da fagocitose e podem ser identificados no ejaculado. Em equinos, foi verificada relação entre a ubiquitinação dos espermatozoides e as variações estacionais ocorridas na produção espermática (SUTOVSKY *et al.* 2001, 2003).

3.1 Classificação dos defeitos

As anomalias morfológicas dos espermatozoides podem ser classificadas de várias formas, durante muito tempo os defeitos espermáticos foram classificados pela região na qual se encontravam – cabeça, acrossoma, cauda e peça intermediária. Outras classificações dividem os grupos de defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (HOWARD e PACE, 1988; CBRA, 1998; FRENEAU, 2011).

3.1.1 Defeitos Primários e Secundários

Blom (1950) classificou os defeitos espermáticos em Primários, Secundário, de acordo com a sua origem (Tabela 3)

O grupo de anomalias primárias é composto pelos defeitos originados no epitélio seminífero, durante a espermatogênese. Defeitos secundários é um grupo de defeitos que afetam o espermatozóide já formado, originados distalmente ao epitélio seminífero, nas vias intra e extratesticulares, durante o armazenamento e a ejaculação. Em touros normais, as cabeças destacadas – cabeça isolada normal – podem ocorrer com baixa frequência e a elevação da sua quantidade pode significar o início de uma degeneração testicular (Blom, 1950). Freneau (2011) considera que existam ainda anomalias terciárias, originados pela manipulação dos espermatozoides após a ejaculação. – Acrossoma destacado, peça intermediária fraturada ou em saca rolha, cabeça isolada normal, retroaxial, cauda dobrada ou enrolada.

Tabela 3 – Defeitos Primários e Secundários segundo Blom (1950)

Primários	Secundários
Acrossoma (Granulo persistente ou Knobbed, destacado e outros)	Cauda dobrada ou enrolada com gota
Gota citoplasmática proximal	Gota citoplasmática distal
Subdesenvolvido	Cabeça isolada normal
Cabeça isolada patológica	Abaxial, retroaxial e oblíqua
Cabeça estreita na base	Cauda dobrada ou enrolada
Cabeça piriforme	
Cabeça pequena anormal	
Contorno anormal	
Cabeça c/ vacúolos nucleares (pouch formation ou diadema, cratera)	
Formas teratológicas	
Peça intermediária (saca-rolha Corkscrew, fibrilação, desnuda, fratura, edema, peça intermediária rudimentar ou stump, pseudo-gota e outros)	
Cauda fortemente dobrada/enrolada	
Cauda enrolada na cabeça	
Cabeça curta, larga, gigante, pequena	
Cabeça delgada	

3.1.2 Defeitos Maiores e Menores

Em 1973, Blom associou a classificação ao grau de importância do defeito para a fertilidade, classificando-os assim em defeitos Maiores e Menores, devendo ser expressos em porcentagem.

Tabela 4- Defeitos Maiores e Menores, segundo Blom 1973

Maiores	Menores
Defeitos de Acrossoma (<i>Knobbed</i> , persistente, Destacado)	Grânulo Gota citoplasmática Distal
Gota Citoplasmática Proximal	Cabeça Delgada
Subdesenvolvido	Cabeça curta, larga, gigante, pequena
Cabeça isolada Patológica	Cabeça isolada normal
Cabeça estreita na Base	Inserção Abaxial, retroaxial e oblíqua
Cabeça Piriforme	Cauda dobrada ou enrolada
Cabeça Pequena Anormal	
Contorno Anormal	
Cabeça com vacúolos (<i>Diadema</i> ou <i>pouch formation</i>)	
Peça intermediária (<i>saca-rolha Corkscrew</i> , fibrilação, desnuda, fratura, edema, peça intermediária rudimentar ou <i>stump</i> , pseudo-gota e outros)	
Formas Teratológicas	
Cauda fortemente dobrada/enrolada	
Cauda enrolada na cabeça	
Cauda dobrada ou enrolada com gota	

3.1.3 Defeitos Compensáveis e Não Compensáveis

De acordo com Saacke (1998), os defeitos espermáticos podem ser classificados em compensáveis e incompensáveis. O autor considera compensáveis aqueles que são importantes para o transporte do espermatozóide no trato reprodutor feminino, até o bloqueio da poliespermia e os que são importantes para a manutenção da fertilização e posteriormente a embriogênese, são considerados defeitos não compensáveis, que foram associados a defeitos na cromatina dos espermatozoides e são significativos em células normais ou quase normais acompanhados de células anormais – principalmente cabeças com contorno anormal (SAACKE, 2008). Este pode resultar na clivagem tardia e no fracasso em estabelecer o reconhecimento materno.

3.2 Defeitos Genéticos

Nas condições normais de reprodução existe uma seleção natural contra fatores hereditários, reduzindo a fertilidade. Existem barreiras naturais tanto no trato reprodutivo do macho quanto no da fêmea capazes de remover gametas defeituosos. Porém, métodos mais modernos envolvendo avançadas tecnologias de reprodução assistida – por exemplo: FIV e ICSI – por contornar estas barreiras, podem propagar estes fatores. (SAACKE, 1968).

Deve-se considerar que os defeitos mais variáveis na natureza podem ser influenciados pela associação da interação do ambiente com a predisposição genética. (CHENOWET, 2005) O número de defeitos genéticos identificados nos espermatozoides de bovinos é consideravelmente maior do que em muitas outras espécies, isto implica em um exame mais criterioso nesta espécie, seguindo protocolos adequados (CHENOWET, 2005).

A “National Association of Artificial Breeders” (NAAB) nos EUA, reconhecendo a importância de identificar este tipo de defeito e, para garantir a eficácia dos programas implementados na Inseminação Artificial, e estabelecer os defeitos com base genética, exige que algumas questões sejam respondidas e, a partir do momento que o defeito é reconhecido como genético, é importante estabelecer alguns outros pontos como: a sua base fisiológica; seu modo de herança; suas conseqüências econômicas; um teste diagnóstico rápido, barato e preciso; e procedimentos de controle. (CHENOWET, 2005)

3.3 Principais defeitos de acordo com a localização no espermatozóide

3.3.1 Cabeça

A cabeça do espermatozóide é formada basicamente pelo acrossoma, núcleo, estruturas do citoesqueleto e citoplasma. (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>)

A forma da cabeça do espermatozóide é derivada da forma do núcleo (BARTH E OKO, 1989)

Os defeitos de cabeça indicam uma espermatogênese imperfeita, tendo origem no epitélio seminífero, os mesmo diminuem no trajeto do ducto deferente até a ejaculação pois muitos são fagocitados na via excretora (GARCIA, 1971; CRABO *et al.* 1971)

3.3.1.1 Acrossomo

O acrossomo recobre cerca de 60% do núcleo, consiste em uma estrutura de camada dupla – interna e externa -, contendo acrosina, hialuronidase, e outras enzimas hidrolíticas, sendo responsável pelas reações físico-químicas que resultam na fusão com a membrana plasmática do óvulo e fertilização. É dividido em acrossomo anterior - ou segmento apical - e o segmento equatorial - ou acrossomo posterior. O segmento posterior do núcleo é recoberto pela cápsula pós acrossômica. (SALISBURY, 1978; <http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>)

As anormalidades de acrossoma, quando em altas proporções, são relacionadas com esterilidade total dos machos, porém, quando em baixa frequência – de 1 a 2%- pode ser encontrada em animais com fertilidade aparentemente normal (BANE E NICANDER, 1965). São alterações na constituição da membrana deste e são formadas durante a espermiogênese, na fase acrossomal.

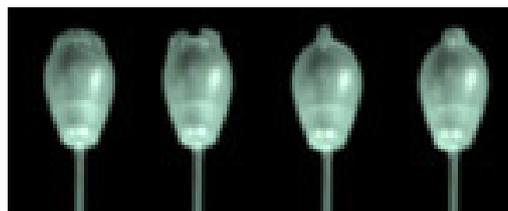
As lesões de acrossomo podem ser causadas por diversos fatores como: envelhecimento, choque térmico e manipulação inadequada do sêmen durante o processamento. podem ser considerados de origem primária ou secundária, segundo a

classificação de Blom (1950) e são considerados defeitos maiores na classificação do mesmo autor em 1973. (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula>)

Alguns animais apresenta predisposição genética para desenvolver anomalias de acrossoma em condições adversas, esta hipótese foi sugerida pela ocorrência de três defeitos: *Knobbed*, *Ruffled* e *Acrossomas* incompletos em quatro filhos de um touro Holstein sub-fértil (CHENOWET, 2005).

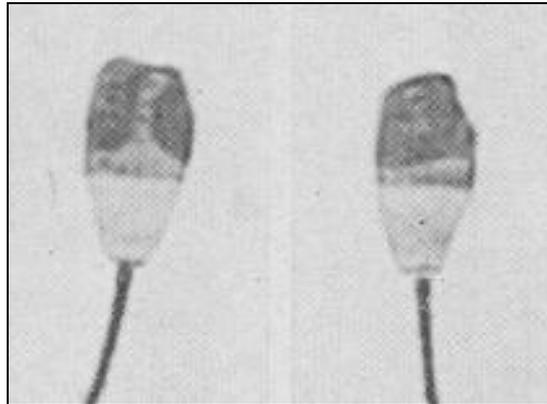
O defeito *Knobbed*, ou grânulo persistente pode ter origem de gene autossômico recessivo com herança ligada ao sexo e segundo Thundathil, *et al* (2000). Em touros, se manifesta com ápice acrossomal engrossado ou com reentrâncias. Pode ser causado por um crescimento descontrolado do sistema acrossomal - assim como os principais defeitos de acrossoma - apresentando-se como uma região cística na microscopia eletrônica (BANE E NICANDER, 1965). Espermatozóide contendo este defeitos perdem ou reduzem sua capacidade de se anexar ao óvulo (THUNDATHIL *et al.*, 2000), diminuem o trânsito no trato genital da vaca (MITCHELL, SENGER, ROSEMBERG, 1985), assim, pode ser classificado tanto como compensável quanto como não compensável, variando a proporção de infertilidade dos animais acometidos dependendo da causa ou do número de espermatozóides não afetados que chegam até o local da fertilização (CHENOWET, 2005)

Figura 2- Espermatozóides com defeito Knobbed



Fonte: Adaptado de Freneau (2011)

Figura 2 - A esquerda Acrossoma "Ruffled", a direita, Acrossoma Incompleto



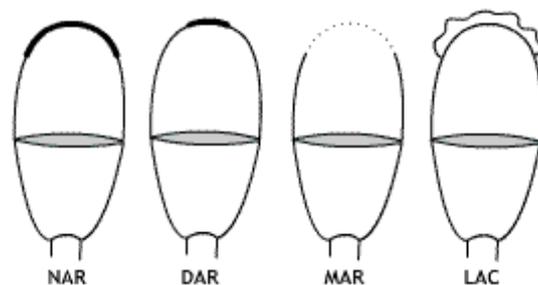
Fonte: Adaptado de Saacke, 1968

É aceita também, para defeitos de acrossoma, a classificação segundo Pursel (1972), onde :

- NAR (normal apical ridge) é o espermatozóide com acrossomo sem alteração
- DAR: (Defective apical ridge): é quando existem irregularidades na margem anterior do acrossoma.
- MAR: (missing apical ridge) não é possível observar a parte anterior do bordo apical
- LAC: (loose acrosomal cap) perda do acrossomo, permanecendo o segmento equatorial

DAR é considerado um defeito de origem primária, enquanto LAC e MAR são relacionados com a manipulação inadequada durante o processamento do sêmen, podendo ocorrer na espermatogênese.

Figura 4 - Defeitos espermáticos, da esquerda para a direita: NAR, DAR, MAR E LAC



Fonte: [http:// penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/](http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/)

3.3.1.2 Núcleo

Um provável defeito espermático não compensável, de herança genética, é a condensação anormal da cromatina ou DNA danificado dentro do núcleo do espermatozóide, porém existe o problema de como detectar estes defeitos de forma que haja a possibilidade de aplicação comercial (OSTERMEIER, 2001). Estas alterações dificultam a descondensação da cabeça do espermatozóide após a fertilização, impedindo a organização e estruturação do pró-núcleo masculino e, assim, resultando em falha do desenvolvimento embrionário (BARTH E OKO, 1989)

É difícil identificar esta anomalia utilizando as técnicas de rotina de avaliação do sêmen, visto que pode estar presente em espermatozóides de aparência normal ou quase normal. O uso de citometria de fluxo juntamente com fluorocromos DNA-específicos se mostra eficiente na detecção de heterogeneidade da estrutura nuclear, associada com falhas na espermatogênese, anomalias nos espermatozóides e infertilidade em algumas espécies (BALLACHEY, HOHENBOKEN, EVANSON, 1987)

Cabeças com contorno anormal, estreitas na base e piriformes são relacionadas a infertilidade, sendo a mais comum delas o formato piriforme da cabeça. Embora possam apresentar boa motilidade e integridade de acrossomo, sendo capazes de penetrar a zona pelúcida, estes espermatozoides podem ser incapazes de fertilizar o óvulo ou de ter um desenvolvimento embrionário normal. São associadas à degeneração e hipoplasia testicular, quando presentes em elevado número, podem também estar relacionadas a elevação de temperatura no testículo (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>, BARTH e OKO, 1989).

Cabeças delgada, pequena, gigante, curta e cabeça isolada normal são considerados defeitos menores segundo Blom (1973).

Cabeças isoladas no ejaculado de touros normais é um achado comum. Pode ser visto também em touros com anomalias testiculares ou inflamação no epidídimo e vesículas seminais, assim como em touros testados no início da estação reprodutiva, com seguida diminuição a valores normais após sucessivas ejaculações, pois acredita-se que quando armazenados por longos períodos, devido a inatividade reprodutiva, os espermatozóides fragmentam-se no epidídimo. Segundo Bloom (1977) as seguintes características foram propostas como indicativos deste defeito especificamente: Cabeças e caudas são separadas em

80 a 100% do total de espermatozóides do ejaculado; Uma elevada porcentagem de caudas soltas apresenta movimento ativo; muitas vezes apresenta dobra proximal na peça intermediária envolvendo a gota proximal.

Defeitos na cabeça como vacúolos, quando dispostos em anel, ao redor da cabeça, são referidos como Diadema. Estes defeitos são observados como invaginações da membrana nuclear e é possível de serem observados em microscopia de contraste de fases ou DIC (microscopia de contraste de interferência diferencial). Em amostras coradas com os protocolos de coloração de Williams, Giemsa, Hematoxilina-Eosina, o defeito só é visto observado se os vacúolos são muito grandes. Podem ser vistos, frequentemente, em associação com cabeças piriformes. Este defeito reduz a viabilidade do embrião. (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>).

3.3.2 Colo

Relacionados ao colo, são descritos os defeitos de implantação – abaxial, retroaxial, paraxial –, determinadas por alteração da goteira de implantação, que pode se apresentar rasa ou assimétrica. E a presença da gota citoplasmática proximal, considerado um defeito maior, que pode estar presente no ejaculado em porcentagens baixas, nunca acima de 3%. Um elevado número de gota citoplasmática proximal pode ser indício de imaturidade sexual, neste caso é transitória, de degeneração testicular – onde é observada esta anomalia com mais frequência na fase inicial e final do processo – e em casos de hipoplasia testicular, quando associada a outros defeitos, como cabeça piriforme em touros adultos (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>).

3.3.3 Cauda

A cauda do espermatozóide é dividida em peça intermediária, peça principal e peça terminal. A peça intermediária está envolta pela hélice mitocondrial e vai até o anel de Jensen. Na peça principal nota-se um estreitamento da cauda devido ao término da bainha

mitocondrial e início da bainha fibrosa, que tem por característica ser mais delgada. A peça terminal não possui bainha fibrosa, mas apenas um feixe de fibras axiais que percorre longitudinalmente, pelo centro, a cauda do espermatozóide (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>, CHENOWET, 2005)

3.3.3.1 Defeitos da Cauda

São os defeitos mais comuns de serem encontrados em um espermograma bovino, representados por : cauda dobrada, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota. (FERNANDES e MORAES, 2009) São observados com maior frequência em ejaculados de touros com alterações epididimais, em função do ambiente hiposmótico, que favorece as alterações na cauda dos espermatozoides (AMMAN e HAMMERSTED, 1993).

A cauda simplesmente dobrada pode ocorrer na ocasião de redução brusca de temperatura ou choque térmico, quando este defeito é associado a outras patologias de cauda - cauda fortemente dobrada, por exemplo – pode estar relacionado a disfunção epididimária. É comum a gota distal ficar retida na dobra da cauda (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>).

A cauda fortemente dobrada ou enrolada é descrito como um forte enrolamento ou dobramento da peça intermediária e cauda do espermatozóide, com ruptura de fibrilas. Tem caráter de transmissão genética e ocorre durante a passagem das células no epidídimo e pode ser associada com altos teores de zinco no plasma seminal. Descrita por Blom (1966) em um touro Jersey chamado Dag – também conhecida como *Dag defect* – foi identificada também em outras raças bovinas.

3.3.3.2 Defeitos de Peça Intermediária

Defeitos como: peça intermediária fraturada, em saca rolhas e *stump*, ocasionam uma diminuição da motilidade e do vigor espermático, sem melhora nas coletas subsequentes. Estes defeitos são originários do túbulo seminífero devido a perda e/ou desorganização dos feixes de fibras ou mitocôndrias da peça intermediária. (BARTH e OKO, 1989)

A peça intermediária em saca rolhas – *cork screw defect* – foi descrito por Blom, em 1959. É caracterizada por uma distribuição anormal das mitocôndrias na ao longo da peça intermediária, dando esta aparência. Já o *stump sperm defect* é a fragmentação e desorganização desta estrutura, que se apresenta encurtada ou como uma estrutura arredondada e sem o restante da cauda, este defeito tem caráter de transmissão genético. (<http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/>)

A gota citoplasmática distal é uma estrutura que normalmente é liberada do espermatozóide quando este entra em contato com os fluidos das glândulas anexas, relacionada com disfunção epididimária e redução da fertilidade, podendo ocorrer em amostras normais. A pseudogota é semelhante ao defeito anterior, mas ocorre na bainha mitocondrial, sendo descrito inicialmente em touros Holandeses, tem caráter de transmissão genética. ([http:// http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/](http://penta3.ufrgs.br/veterinaria/celula/))

A discinesia ciliar primária se apresenta como uma série de anomalias que afetam estruturalmente todas as células ciliadas do indivíduo afetado – espermatozóides, cílios das vias respiratórias. São relacionados a problemas na codificação genética. Em humanos é relacionada com a síndrome de Kataganer (LEESTEMA e SEPSSENWOL, 1980)

4 CONCLUSÃO

A avaliação do sêmen, como o exame clínico e as outras etapas do exame andrológico, dos reprodutores é indispensável para atestar a aptidão dos mesmos a monta natural ou coleta de sêmen em centrais de inseminação artificial ou até mesmo em fazendas. Deve ser realizado periodicamente, visto que algumas alterações podem ser transitórias e outras comprometem a qualidade do ejaculado ou por diminuição da fertilidade ou por transmissão genética de alguns defeitos espermáticos indesejáveis.

Embora existam novas técnicas, as quais trazem mais facilidade com maior repetibilidade a análise, estas são limitadas ao uso em grandes centrais de inseminação devido ao custo elevado e limitações quanto ao transporte e manipulação.

As avaliações de rotina, a campo ou em centrais de reprodução são realizadas ainda, na sua grande maioria, por esfregaço corado em microscopia de campo claro, por preparação úmida em microscopia de contraste de fases ou DIC. Deste modo é necessário o conhecimento das características morfológicas e fisiopatológicas dos defeitos espermáticos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **J. Cell. Sci.** v 114, p. 1665–1675. 2001

SUTOVSKY, P.; REGINA, M.T.; HAMEED, S.; SUTOVSKY, M. Differential Ubiquitination of Stallion Sperm Proteins: Possible Implications for Infertility and Reproductive Seasonality. **Biology of Reproduction** v.68, p. 688–698, 2003.

LEESTMA, J.E.; SEPSHWOL, S. Sperm tail axoneme alterations in the Wobbler mouse. **J Reprod Fert** v 58. p 267–70. 1980

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1.ed. **Iowa State University Press**: Ames, 1989

FERNANDES, CE; MORAES, JCF Avaliação Clínica e Exame de Sêmen no Touro. In: Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos. 1 ed. Corumbá: Embrapa Pantanal; Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: 1998. p.49.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K. A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, n. 3, p. 299-303, 1993.

LINFORD, E.; GLOVER, F. A.; BISHOP, C.; STEWART, D. L. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. **Reproduction**, v. 47, p. 283-291, July 1976. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/content/47/2/283.full.pdf>.

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, n. 4, p. 595-603, Jul./Aug. 2001. Disponível em: <http://pages.stat.wisc.edu/~yandell/doc/2001/50.JAndrol.pdf>.

PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 3, p. 215-299, Nov. 2004.

RAO, A. R.; 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, n. 1, p. 1-12, July 1980.

THIBIER, Michel. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 235-242, 2005.

CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.

SAACKE, R.G. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, v.70, p.473-478, 2008.

FRENEAU, G.E.; PUOLI, J. R.; BORJA A.L.R.. Índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP) em touros Nelore: Estudo de estação de acasalamento em Mato Grosso do Sul. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 37, 2000, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa, MG: SBZ, 2000. p.177-181.

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

SAACKE, R. G. et al. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 663-677, 2000.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 327-336, 2000.

PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 3, p. 215-229, 2004.

FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.160-170, abr./jun. 2011. Disponível em www.cbra.org.br

ARRUDA, R. P; BALL B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Sci Vet*, v.31, supl., p.226-227, 2003.

ARRUDA R.P.; ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ O.F.B.; MARTINS, S.M.M.K; ALONSO, M.A. Addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation in post-thawed equine sperm. *Anim Reprod*, v.7. p.285-285, 2010.

ARRUDA, R.P et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011. Disponível em www.cbra.org.br

GARDES T.P.; CARDOSO R.N.R; ARRUDA, R.P.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; GALLEGO, A.M. ANDRADE, F.C. Comparação da eficiência de meios para a capacitação dos espermatozóides através das análises por citometria de fluxo e computadorizada da motilidade. In: **Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga-SP. Anais USP/FMVZ**, v 3 2010.

Nascimento, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, C.C.C; ARRUDA, R.P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **J Equine Vet Sci**, v.28, p.351-358, 2008.

HOEARD, T.W.; PACE, M.M. Seminal evaluations and artificial examination. In: **Fertility and infertility in veterinary practice**. 4.ed. London: Bailliere Tindall. p.39-51. 1988

BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fert. & Steril.**, v 1(3): p 23-35, 1950

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nor. Veterinaemed.**, v 25 (77/8): p 383-91, 1973.

BANE, ALLAN; NICANDER, LENNART. Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 1, p. 133-138, 1966.

MITCHELL, J. R. et al. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. **Journal of animal science**, v. 61, n. 4, p. 956, 1985.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; RAMPACEK, G. B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v. 34, n. 2, p. 278-283, 1972.

BALLACHEY, B. E.; HOHENBOKEN, W. D.; EVENSON, D. P. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of reproduction**, v. 36, n. 4, p. 915-925, 1987.