

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Cerrados  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Atlas de Morfologia Espermática Bovina**

*Carlos Frederico Martins  
Margot Alves Nunes Dode  
Antônio Emídio Dias Feliciano Silva  
Editores Técnicos*

**Embrapa**  
*Brasília, DF  
2016*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

BR 020, Km 18, Rodovia Brasília/Fortaleza

CEP 73310-970 - Planaltina, DF

Caixa Postal 08223

Fone (61) 3388-9815 - Fax (61) 3388-9879

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

**Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição**

Embrapa Cerrados

Comitê de Publicações

Presidente

*Claudio Takao Karia*

Secretária executiva

*Marina de Fátima Vilela*

Secretárias

*Maria Edilva Nogueira*

*Alessandra S. Gelape Faleiro*

Membros

*Cícero Donizete Pereira*

*Gustavo José Braga*

*João de Deus Gomes dos Santos Júnior*

*Jussara Flores de Oliveira Arbues*

*Sebastião Pedro da Silva Neto*

*Shirley da Luz Soares Araújo*

*Sonia Maria Costa Celestino*

Supervisão editorial

*Jussara Flores de Oliveira Arbues*

Revisão de texto

*Jussara Flores de Oliveira Arbues*

Normalização bibliográfica

*Shirley da Luz Soares Araújo*

Capa, projeto gráfico, diagramação e  
tratamento de figuras

*Renato Berlim Fonseca*

Foto principal da capa: *Fabiano Bastos*

Fotos da capa, da esquerda para a direita -  
fotos: 1, *Antônio Emídio Dias Feliciano Silva*;  
2, 3, 5 e 6, *Carlos Frederico Martins*; 4, *Elisa  
Ribeiro da Cunha*

**1ª edição**

1ª impressão (2016): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução desta publicação, no todo ou  
em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Cerrados

---

A88 Atlas de morfologia espermática bovina / Carlos Frederico Martins, Margot  
Alves Nunes Dode, Antônio Emídio Dias Feliciano Silva, editores técnicos.  
- Brasília, DF : Embrapa, 2016.

100p. : il. color. ; 21 cm x 29,7 cm

ISBN 978-85-7035-540-9

1. Espermatozoides. 2. Líquido seminal. 3. Bovino. I. Martins, Carlos  
Frederico. II. Dode, Margot Alves Nunes. III. Silva, Antônio Emídio Dias  
Feliciano. IV. Embrapa Cerrados.

---

CDD 636.2

© Embrapa 2016



# Autores

## **Antônio Emídio Dias Feliciano Silva**

Médico-veterinário, doutor em Fisiopatologia da Reprodução Animal, professor do Centro Paulista de Estudos Agropecuários, São Carlos, SP

## **Carlos Frederico Martins**

Médico-veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

## **Carolina Gonzales da Silva**

Médica-veterinária, mestre em Biologia Animal, Brasília, DF

## **Elisa Ribeiro da Cunha**

Médica-veterinária, mestre em Biologia Animal, extensionista rural da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal, Brasília, DF

## **José de Oliveira Carvalho**

Médico-veterinário, doutor em Ciência Animal e Pastagens, professor da Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Medicina Veterinária, Vitória, ES

## **Margot Alves Nunes Dode**

Médica-veterinária, doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF





# Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e à Embrapa pelo apoio ao projeto *Estudo de diferentes avaliações do sêmen criopreservado bovino importado para subsidiar a fiscalização de germoplasma masculino pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*, que forneceu subsídios para publicar este livro.





# Apresentação

A avaliação dos espermatozoides congelados de bovino deve abordar os parâmetros de motilidade, concentração, morfologia e a integridade de outros compartimentos, como acrosoma e membrana plasmática. Dentro desse contexto, este atlas espermático tem o objetivo de apresentar informações sobre as técnicas de avaliação do sêmen congelado e, principalmente, imagens estruturais de espermatozoides bovinos normais e anormais, obtidas por técnicas convencionais e avançadas de microscopia. Com isso, pretende-se que este material sirva como apoio aos estudantes e veterinários durante avaliação da estrutura espermática a ser realizada a campo ou no laboratório.

*José Roberto Rodrigues Peres*  
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados







# Sumário

|   |    |
|---|----|
| Capítulo 1 - Morfofisiologia Espermática, Aspectos da Criopreservação de Sêmen Bovino e Importância da Avaliação Laboratorial ..... | 11 |
| Estrutura Espermática Bovina.....   | 11 |
| Morfofisiologia Espermática .....   | 13 |
| Criopreservação Espermática e a Importância da Avaliação Laboratorial do Sêmen Congelado .....                                      | 16 |
| Referências.....  | 17 |
| Capítulo 2 - Avaliação Espermática Laboratorial .....   | 19 |
| Técnicas para Avaliação Seminal, Estrutura e Função Espermática.....  | 19 |
| Avaliação inicial do sêmen bovino fresco .....  | 19 |
| Avaliação da concentração espermática .....   | 20 |
| Avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer .....   | 20 |
| Avaliação da motilidade espermática.....  | 20 |
| Avaliações da morfologia espermática.....   | 21 |
| Avaliações de integridade de membrana plasmática .....  | 22 |
| Avaliações de integridade de acrossoma.....   | 24 |
| Avaliações de integridade de DNA com sondas fluorescentes .....   | 26 |
| Teste para capacitação espermática: hidróclorito de clortetraciclina (CTC).....   | 30 |
| Teste de ligação a zona pelúcida (ZP) .....   | 31 |
| Teste de fecundação com coloração lacmoide.....   | 31 |
| Capítulo 3 - Atlas Microfotográfico .....   | 33 |
| Espermatozoides Normais.....  | 33 |
| Defeitos de Peça Intermediária .....  | 56 |
| Defeitos de Cauda Espermática .....   | 65 |
| Outros Elementos Seminais.....  | 75 |
| Avaliações Espermáticas Complementares.....   | 76 |



# Capítulo 1

## **Morfofisiologia Espermática, Aspectos da Criopreservação de Sêmen Bovino e Importância da Avaliação Laboratorial**

Antonio Emídio Dias Feliciano Silva e Carlos Frederico Martins

O Brasil é um dos maiores produtores de sêmen congelado da raça Nelore e Gir, e também um grande importador de sêmen de raças europeias de corte e de leite, especialmente das raças Angus e Holandês.

O intercâmbio de germoplasma de touros de diferentes países é extremamente importante para o melhoramento genético dos rebanhos e depende, entre outros fatores (ex: aspectos sanitários, seleção de reprodutores, coleta, transporte e avaliação de amostras), da eficiência no processo de congelamento do sêmen.

O sêmen congelado é utilizado em diferentes biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial convencional (IA) ou a inseminação artificial tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e fecundação in vitro (FIV).

Sem dúvida, a inseminação artificial representa a primeira geração das biotécnicas reprodutivas, promovendo considerável contribuição para o melhoramento genético bovino. O sucesso na concepção e nos benefícios econômicos dessa técnica depende da viabilidade do sêmen criopreservado para fecundação do ovócito (WATSON, 2000).

Apesar de as empresas produtoras e distribuidoras de sêmen bovino adotarem rigorosos regimes de controle de qualidade das amostras comercializadas, a fiscalização do sêmen produzido nacionalmente e, principalmente, importado de outros países, sempre se fará necessária para o controle, entre outros aspectos, da funcionalidade e sanidade do produto. Para isso, é necessário que os laboratórios credenciados e os próprios veterinários de campo realizem avaliações no sêmen congelado, que sejam suficientemente seguras para identificar eventuais alterações na dose inseminante.

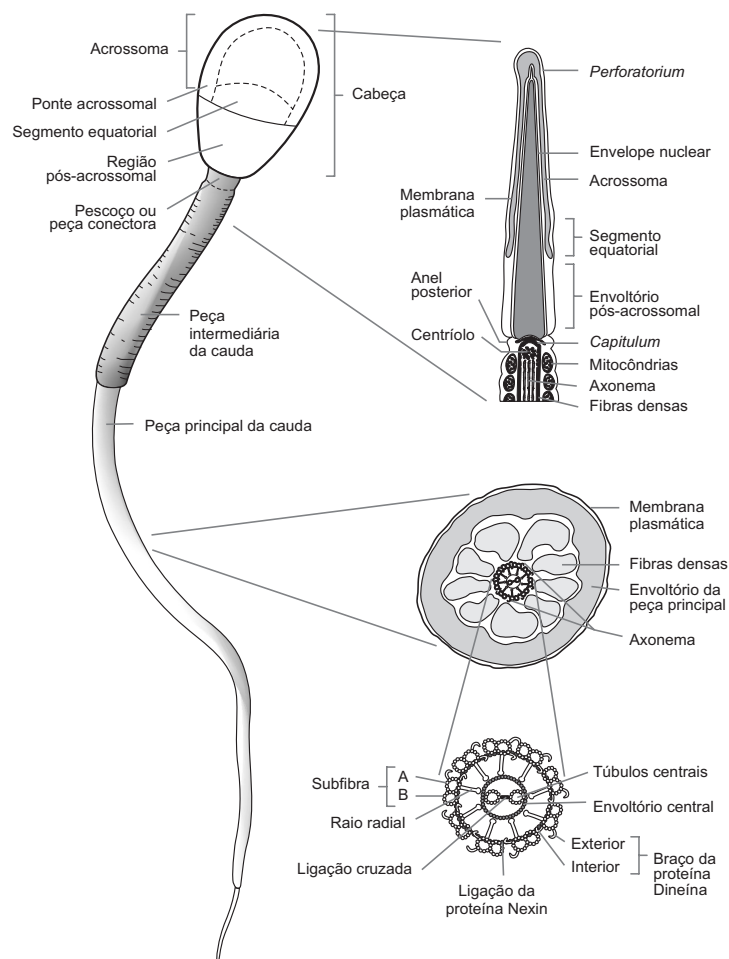
### **Estrutura Espermática Bovina**

A principal característica da cabeça do espermatozoide é o núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compactada. A cromatina condensada compreende um complexo de DNA com uma classe especial de proteínas conhecidas como protaminas. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo, formado por uma dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os últimos estágios de formação do es-

permatozoide (Figura 1). Essa estrutura contém enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases, e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fecundação. Durante a reação do acrossomo, a membrana acrossomal externa funde-se com o plasmalema, sob o controle intra e extracelular do cálcio, induzindo a exocitose de todo o conteúdo acrossomal. As principais funções das enzimas acrossomais são a dispersão das células do *cumulus oophorus* e a lise da zona pelúcida. A membrana interna do acrossomo é relativamente estável e permanece intacta após a reação do acrossomo ter ocorrido. A penetração da zona pelúcida e fusão com o oolema são eventos mediados por receptores, com áreas específicas da cabeça do espermatozoide se aderindo aos alvos no ovócito (HAFEZ, 1995).

A cauda do espermatozoide é composta de colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (Figura 1). A região da cauda entre o colo e o annulus é conhecida como peça intermediária. A parte central da peça intermediária que se estende por todo o comprimento da cauda, forma o axonema. O axonema é composto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, em que a proteína dineína é responsável pela transformação da energia química em mecânica. Todo esse conjunto é recoberto externamente por numerosas mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática.

A peça principal, que continua posteriormente ao annulus e se estende até a parte terminal da cauda, é composta centralmente do axonema e sua associação de fibras. A peça terminal, que é posterior à membrana fibrosa, contém somente o axonema recoberto pela membrana plasmática (HAFEZ, 1995).



**Figura 1.** Diagrama da ultraestrutura do espermatozoide bovino. Principais estruturas identificadas por microscopia de campo claro (a); características das ultraestruturas da cabeça e peça intermediária (b); ultraestruturas da peça principal da cauda (c); detalhes gerais das ultraestruturas do axonema da cauda (d).

Fonte: Bedford e Hoskins (1990).

## Morfofisiologia Espermática

A fecundação é o resultado da perfeita interação entre o gameta masculino e o feminino. Entretanto, para que ocorra um correto desenvolvimento embrionário é necessário que os gametas sejam morfofisiologicamente normais. O gameta masculino se torna normal para exercer a sua função, nas transformações estruturais adquiridas no parênquima testicular, durante a espermatogênese. No entanto, precisa sofrer transformações bioquímicas durante o trânsito no epidídimo para ter maturidade e habilidade de alcançar o ovócito e participar do processo de fecundação.

A aquisição da habilidade de fecundar, competência para se capacitar e sofrer a reação acrossômica, por meio da incorporação de carga proteica e receptora na superfície da membrana, depende do desenvolvimento completo do acrossoma, núcleo e flagelo (MANJUNATH et al., 1993).

Os espermatozoides saem dos testículos ainda imaturos, apresentando resquícios do citoplasma, incompleta condensação da cromatina, insuficiente conteúdo proteico e de outros componentes da membrana plasmática. Se durante o trajeto pelo epidídimo os espermatozoides não finalizarem a sua transformação morfológica devido a algum distúrbio, eles apresentarão alterações na sua morfologia, que poderão afetar o processo de fecundação. (SAACKE et al., 1968; BARROS et al., 1996; BLEIL; WASSARMAN, 1983). Portanto, a competência funcional do espermatozoide pode estar prejudicada por anormalidades morfológicas na cabeça, no núcleo e no flagelo, que se originam do mau funcionamento do parênquima testicular e do epidídimo (RAO, 1971; RAO et al., 1989).

Morfológicamente, o espermatozoide tem que sair no ejaculado já maduro, isto é, com a cromatina completamente condensada, membrana acrossomal íntegra e sem deformação, com a peça intermediária sem danos e o flagelo livre de gota citoplasmática. Isso facilita o transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea para o encontro com o ovócito. Além disso, a membrana íntegra permite a permanência de todos os componentes proteicos e lipídicos necessários para participar do mecanismo de fecundação.

Ao chegarem à cabeça do epidídimo, os espermatozoides com presença de gota citoplasmática proximal, localizada junto à inserção da cabeça, começam a perder esta estrutura. A gota citoplasmática migra para a região distal do flagelo durante a passagem dos espermatozoides pelo corpo do epidídimo até chegar à cauda (HANCOCK, 1959; GUSTAFSSON, 1966; RAO et al., 1980).

Outra mudança morfogênica nesse trânsito epididimal, que ocorre em alguns mamíferos, é a diminuição do tamanho do acrossoma (BEDFORD, 1965). Entretanto, a principal mudança é a diminuição de espermatozoides com morfologia de cabeça anormal, que se originam por distúrbio funcional do testículo (GILLETTE, 1965). O flagelo do espermatozoide também pode sofrer modificações, dependendo mais das condições fisiológicas do epitélio epididimal do que do parênquima testicular (GUSTAFSSON, 1966).

A falta de conhecimento da importância de vários tipos de defeitos tem impacto econômico negativo na produtividade, pois a morfologia espermática está diretamente relacionada ao sucesso da interação espermatozoide-ovócito e do desenvolvimento embrionário inicial. Deve-se ressaltar, entretanto, que algumas anormalidades atualmente são consideradas variações em morfologia individual e podem não afetar a taxa de fecundação.

A identificação das anormalidades morfológicas que refletem a funcionalidade do espermatozoide e, indiretamente, a testicular, bem como a determinação de suas prováveis causas, é importante para a seleção do reprodutor. As principais anormalidades espermáticas e suas causas estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Lista das principais anormalidades espermáticas e suas implicações.

| Anormalidade                       | Causa provável   | Diagnóstico   | Taxa de fecundação  | Tratamento  |
|------------------------------------|--|---|---|---|
| Gota citoplasmática proximal (GCP) | Nos animais jovens devido a incompleto desenvolvimento do epitélio epididimal. Nos adultos por degeneração do epitélio seminífero causado por estresse térmico e doenças | Baixa motilidade; identificação da GCP em microscópio de contraste de fase (CF) e colorações (giemsa, eosina-nigrosina e rosa bengala)                                | Clivagem de 5 a 14% quando há de 12 a 30% de GCP no sêmen. Os espermatozoides são deficientes em proteínas de ligação a zona pelúcida | Favorável: Nos jovens, aguardar o desenvolvimento completo do epitélio epididimal. Nos adultos, eliminar a causa do estresse<br>Desfavorável em caso de degeneração testicular. Na degeneração por doenças, nem sempre é possível recuperar o epitélio epididimal |
| <i>Knobbed sperm</i>               | Estresse térmico (distúrbio de termorregulação testicular) causado por transporte, doenças, genético e intoxicações  | Baixa taxa de fecundação, porém com motilidade normal; identificação por microscopia de CF  | A alta incidência de <i>knobbed sperm</i> resulta em taxas baixas ou nulas de fecundação in vitro                                     | Desfavorável em causas genéticas. Não há tratamento, deve-se eliminar o animal; em outras situações, eliminar a causa do estresse   |
| Cabeça piriforme                   | Genética; estresse térmico (distúrbio de termorregulação testicular); nutricional e uso de corticosteroides  | Motilidade normal; Acrossoma intacto; DNA pode estar danificado; identificação com microscopia de CF e colorações (giemsa, eosina-nigrosina e alaranjado de acridine) | Uso de sêmen com 37% de cabeças piriformes produz 11% de embriões; perda embrionária atinge 23%                                       | Favorável em caso de estresse: eliminar a causa do estresse<br>Desfavorável em causas genéticas. Não há tratamento no caso de danos no DNA  |
| Estreito na base                   | Genética; estresse térmico (distúrbio na termorregulação testicular)   | Motilidade normal; pode afetar a estrutura do DNA; identificação por microscopia de CF e colorações (giemsa, eosina-nigrosina e rosa bengala)                         | Se houver dano no DNA, a taxa de fertilidade é baixa  | Favorável em caso de estresse. Diminuir a causa do estresse<br>Desfavorável em causas genéticas. Não há tratamento no caso de danos no DNA  |

Continua...

**Tabela 1.** Continuação.

| Anormalidade   | Causa provável  | Diagnóstico   | Taxa de fecundação  | Tratamento   |
|--|---|---|---|--|
| Vacúolos nucleares:<br><i>Pouch formation</i> e crateras | Estresse térmico (distúrbio na termorregulação testicular); distúrbios hormonais; nutricionais e genéticos  | Motilidade normal; pode afetar a estrutura do acrosoma e do DNA; identificação com microscopia de CF            | A inseminação artificial com sêmen apresentando 8% de defeitos de contorno resulta em 18% de embriões. Baixas taxas de fecundação in vitro, pois as proteínas e receptores são afetados e diminui a capacidade de se ligar a ZP | Favorável em caso de estresse. Eliminar a causa de estresse térmico (confinamento, transporte ou febre) e mudança alimentar. Desfavorável em causas genéticas. Descartar o animal caso não tenha se recuperado após tratamento |
| Cauda fortemente enrolada ou dobrada                     | Estresse térmico e distúrbio do epitélio epididimal   | Baixa motilidade; identificação com CF e colorações (giemsa, eosina-nigrosina e rosa bengala)                   | Taxa de fecundação normal dependendo da porcentagem do defeito no ejaculado ou dose de sêmen  | Favorável. Eliminar a causa do estresse  |
| Peça intermediária anormal                               | Incompleto desenvolvimento do epitélio epididimal; imaturidade; solução hipotônica; distúrbios dos fluídos do epidídimo e das glândulas anexas  | Motilidade alterada; identificação com microscopia de CF e colorações (eosina-nigrosina, giemsa e rosa bengala) | Alta incidência leva à baixa motilidade e fertilidade   | Favorável. Pode ser recuperado se eliminadas as causas   |
| Quebra de cromatina                                      | Estresse térmico; causas genéticas  | Motilidade normal; identificação com Alaranjado de Acridine e TUNEL   | Não ocorre fecundação se houver fragmentação  | Desfavorável. Eliminar a causa   |
| Gota citoplasmática distal (GCD)                         | Estresse térmico e incompleto desenvolvimento do epitélio epididimal (imaturidade)  | Motilidade normal; identificação microscopia de CF e colorações (eosina-nigrosina, giemsa e rosa bengala)       | Não afeta a fecundação  | Favorável. Pode se normalizar. A gota pode se desprender com a manipulação   |
| Cabeça isolada   | Estresse térmico; laminites; toxemias; degeneração testicular; hipoplasia; inflamações das glândulas anexas; animais com longo período sem coletas de sêmen e manipulação errada do ejaculado | Sem motilidade; identificado com microscopia de CF e colorações (eosina-nigrosina, giemsa e rosa bengala)       | Não há fecundação in vivo e in vitro. Há possibilidade somente com a técnica Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI)   | Favorável se eliminadas as causas. Pode se recuperar   |
| Cabeça microcéfala                                       | Estresse térmico; febre; nutricional; adaptação ao confinamento; distúrbio do epitélio seminífero (animais jovens) e obesidade (animais adultos)  | Identificados com CF e colorações (eosina-nigrosina, giemsa e rosa bengala)                                     | Afeta a fecundação; não apresenta proteínas e receptores de ligação a ZP; Insuficiente DNA  | Favorável se eliminadas as causas  |

## **Criopreservação Espermiática e a Importância da Avaliação Laboratorial do Sêmen Congelado**

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada aproximadamente há cinquenta anos pela descoberta do glicerol como crioprotetor, o que permitiu que o espermatozoide fosse congelado e armazenado por longos períodos (HOLT, 2000). Essa biotecnologia tem sido de grande importância em programas de melhoramento animal, por permitir o uso em larga escala de sêmen proveniente de reprodutores de genética superior, por viabilizar a preservação de material genético de animais em extinção, além de auxiliar a transpor barreiras da infertilidade masculina. No entanto, com exceção da espécie bovina, tem-se obtido baixas taxas de fertilidade com o emprego de sêmen congelado (WATSON, 2000), uma vez que a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após descongelamento encontram-se reduzidas como consequência das injúrias durante o processo de congelação (MEDEIROS et al., 2002).

A criopreservação ocasiona danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (BALL; VO, 2001). A célula espermiática parece sensível ao estresse osmótico como também a adição e a remoção de crioprotetores (WATSON, 2000; BALL; VO, 2001).

O resfriamento, quando efetuado de modo inadequado, causa um choque térmico, que induz a danos parcialmente irreversíveis ao espermatozoide que se caracteriza por padrão anormal de movimento do espermatozoide (movimento circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, lesões no acrossoma, dano à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares. Muitos desses danos são decorrentes das alterações da membrana à medida que os espermatozoides progredem para as mudanças de fase de transição e durante o resfriamento (GRAHAM, 1996).

Com relação à formação de cristais de gelo, eles se formam no espaço extracelular, criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução congelada extracelular que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de resfriamento, a água vai se mover através da membrana e se unir a fase congelada do meio extracelular ou irá se congelar, formando gelo no interior da célula. Na maioria dos casos, células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana (DEVIREDDY et al., 2002).

A célula espermiática também é sensível aos efeitos tóxicos dos crioprotetores, o que torna o uso de determinados componentes comumente utilizados para outras células inviáveis para a célula espermiática (WATSON, 2000).

Por ser uma célula complexa, o espermatozoide torna-se infértil quando um de seus atributos bioquímicos ou morfológicos é afetado. Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermiática (número total de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e morfologia) têm se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozoide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (SANTOS, 2003). A avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade, portanto, a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial é mais apropriada para diagnóstico da funcionalidade e integridade do espermatozoide (MELO; HENRY, 1999).



Os métodos de coloração empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. As sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a viabilidade celular. Alguns corantes fluorescentes específicos para DNA (ácido desoxirribonucleico), por serem impermeáveis às membranas intactas, coram apenas células com membrana plasmática lesada. As lecitinas fluorescidas se ligam de forma específica a glicoconjugados presentes no acrossomo, e, também, têm sido utilizadas para avaliar integridade do acrossomo em diversas espécies.

Entre os compartimentos sobre os quais a criopreservação pode causar algum tipo de efeito negativo na célula espermática, o núcleo pode ser considerado um elemento importante, mas tem sido sempre considerado uma estrutura mais estável. Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a estrutura da cromatina e condição do DNA (ERENPREISS et al., 2004). Entre os principais métodos, a coloração com acridine orange (AO) e o TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling) têm sido os testes mais amplamente utilizados para avaliar a qualidade nuclear espermática (MARTINS et al., 2007).

## Referências

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARROS, C.; CROSBY, J. A.; MORENO, R. D. Early steps of sperm egg interactions during mammalian fertilization. **Cell Biology International**, v. 20, p. 33-39, 1996.

BEDFORD, J. M. Changes in the fine structure of the rabbit sperm head during passage through the epididymis. **Journal of Anatomy**, v. 99, p. 891-906, 1965.

BEDFORD, J. M.; HOSKINS, D. D. Normal reproduction in male animals. In: ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H.; PARKINSON, T. J. **Veterinary reproduction and obstetrics**. 6. ed. London: W. B. Saunders, 1990. p. 551-571.

BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of event and induction of acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. **Developmental Biology**, v. 9, p. 317-324, 1983.

DENVIREDDY, R. V.; SWALUND, D. J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSON, M. H. T.; BISCHOF, J. C.; ROBERTS, K. P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 222-231, 2002.

ERENPREISS, J.; JEPSON, K.; GIWERCMAN, A.; TSAREV, I. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2277-2282, 2004.

GILLETTE, E. L. **Morphology of bovine epididymal spermatozoa after X-irradiation of testes**. 1965. Thesis (PhD.) - Colorado State University, Fort Collin, Colorado.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GUSTAFSSON, B. Luminal contents of the bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. **Acta Veterinaria Scandinavica**, suppl. 117, 80 p. 1966.

HAFEZ, E. S. E.; GARNER, D. L. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 167-190.

HANCOCK, J. L. The morphology characteristics of spermatozoa and fertility. **International Journal of Fertility**, v. 4, p. 347-359, 1959.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

MANJUNATH, P.; CHANDONET, L.; LEBLONG, E.; DESNOYEERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27-37, 1993.

MARTINS, C. F.; DODE, M. N.; BAO, S. N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 94-104, 2007.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.

RAO, R. A. **Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis**. 1971. Thesis (PhD.) - Department of Obstetrics and Gynaecology, Royal Veterinary College, Stockholm. p. 86, 1971.

RAO, B.; SOUFIR, J. C.; MARTIN, M.; DAVID, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, v. 24, p. 127-134, 1989.

RAO, R. A.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B. K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, p. 1-3, 1980.

SAACKE, R. G.; AMANN, R. P.; MARSHALL, C. E. Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 1391-1399, 1968.

SANTOS, G. C. J. **Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 481-492, 2000.

# Capítulo 2

## Avaliação Espermática Laboratorial

Carlos Frederico Martins e Margot Alves Nunes Dode

A avaliação do potencial de fertilidade de uma amostra de sêmen é de grande importância para o emprego de biotécnicas de reprodução como a inseminação artificial (IA) e a produção in vitro de embriões (PIVE). Os métodos mais usados para a avaliação de sêmen em centrais de inseminação artificial e congelamento de sêmen consistem basicamente da análise subjetiva da motilidade, da concentração e da morfologia espermática.

Recentemente, o uso de técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático e a análise morfofuncional por corantes e sondas fluorescentes complementam a avaliação do potencial de fertilidade das amostras de sêmen congelado. A avaliação da estrutura espermática do sêmen bovino que sofre as injúrias da criopreservação, envolve a avaliação da morfologia espermática e avaliação complementar de estruturas importantes para o movimento espermático e especialmente para a fecundação, tais como: membrana plasmática, acrosoma, mitocôndrias e núcleo. Nesse sentido, serão descritas as principais técnicas de análises espermáticas que podem ser realizadas a campo ou no laboratório por meio de microscopia ou citometria de fluxo tanto para sêmen fresco como para sêmen congelado.

### Técnicas para Avaliação Seminal, Estrutura e Função Espermática

#### Avaliação inicial do sêmen bovino fresco

Considerar:

- Volume médio do ejaculado: 5 mL - 8 mL.
- Concentração média espermática: 800 spz/mL - 2.000 spz/mL x 10<sup>6</sup> spz/mL.
- Coloração uniforme e aparência opaca com ausência de sangue e sujidades.

## Avaliação da concentração espermática

### Classificação da concentração do sêmen a fresco pela observação da cor e densidade

#### Considerar:

- Sêmen denso, cremoso, amarelo opaco: 800 milhões a 1 bilhão de espermatozoides por mL.
- Sêmen leitoso, pouco denso: 500 milhões a 800 milhões de espermatozoides por mL.
- Sêmen ralo, opalescente: 200 milhões a 500 milhões de espermatozoides por mL.
- Sêmen aquoso, oligospérmico: menos de 200 milhões de espermatozoides por mL.

### Avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer

#### Procedimento

- Diluir a amostra espermática em formol salina 1,6%. Para sêmen fresco, diluir 5 µL da amostra de sêmen em 995 µL de formol salina (diluição de 1:200); e para sêmen congelado, diluir 5 µL da amostra de sêmen em 95 µL de formol salina (diluição de 1:20).
- Colocar a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preencher com 10 µL da amostra.
- Esperar 5 minutos para que os espermatozoides decantem.
- Contar 5 quadrantes centrais ou em diagonal, contando as linhas em "L".
- Contar nos 2 compartimentos da câmara de Neubauer. A diferença entre as duas contagens não deve ser superior a 10%.

#### Cálculo da concentração

- Conta-se os dois lados da câmara de Neubauer e faz-se a média aritmética dos espermatozoides contados. O valor encontrado deve ser multiplicado por um fator de correção de 10.000 que é referente a área contada, altura da câmara e diluição de 1/200 utilizada, de acordo com a seguinte fórmula abaixo.

Número de espermatozoides contados

$$\frac{\text{Número de espermatozoides contados}}{1/5^* \times 1/10^{**} \times 1/200^{***}}$$

Em que:

\* área contada

\*\* altura da câmara de Neubauer

\*\*\* diluição utilizada

Obs: O resultado final é fornecido em espermatozoides por mm<sup>3</sup>. Para se obter a concentração em espermatozoides por mL, multiplica-se o valor anterior por 1.000 (1 mL = 1.000 mm<sup>3</sup>).

## Avaliação da motilidade espermática

### Determinação subjetiva da porcentagem de espermatozoides móveis

- Colocar uma gota de sêmen (10 µL) sobre a lâmina de vidro.
- Colocar uma lamínula sobre a gota de sêmen.

- Avaliar a porcentagem de espermatozoides móveis em microscópio de campo claro ou de contraste de fase.

Obs: é importante que a lâmina e lamínula sejam previamente aquecidas em placa aquecedora a 37 °C. Caso seja necessário, diluir a amostra de sêmen fresco com citrato de sódio a 3% ou com solução salina 0,9%.

### Análise computadorizado do movimento espermático (Casa)

- Ajustar o setup do Casa para o sêmen da espécie a ser avaliada. Na Tabela 1, pode-se observar um exemplo de setup para bovinos.
- Colocar uma amostra de sêmen na câmara de leitura. Usar 6 µL a 10 µL para câmara de Makler ou 2 µL para câmara Leja.
- Colocar a câmara na plataforma de leitura do Casa.
- Selecionar no mínimo 3 campos de leitura, evitando campos com bolhas ou sujidades para fazer a leitura.

**Tabela 1.** Ajuste do equipamento Hamilton Thorne Biosciences (Ivos-Ultimate 12) para bovinos.

| Característica                         | Ajuste  |
|--|---------|
| Número de imagens adquiridas por campo | 30      |
| Taxa de aquisição das imagens          | 60 HZ   |
| Contraste mínimo das células           | 80      |
| Tamanho mínimo de células              | 5 pix   |
| Velocidade de trajeto (VAP)            | 50 µm/s |
| Retilinearidade (STR)                  | 75%     |
| Valor de corte VSL para células lentas | 10 µm/s |
| Seleção de campo                       | Manual  |

Observação: Caso seja necessário, diluir a amostra de sêmen com citrato de sódio a 3% ou com solução salina 0,9 % para padronização da concentração espermática.

## Avaliações da morfologia espermática

### Procedimento em microscópio de contraste de fase

- Colocar uma amostra de sêmen fresco ou congelado até turvar a solução de formol salina 1,6%.
- Colocar uma amostra na lâmina, cobrir com lamínula e avaliar em microscópio de contraste de fase em objetiva com aumento de 100x com óleo de imersão.
- Avaliar 200 espermatozoides e classificar os defeitos morfológicos.

### Procedimento em microscópio de campo claro com corante rosa bengala

#### Preparo do corante

- 3 g de rosa bengala.
- 100 mL de água destilada.

### Procedimento para preparação da amostra

- Homogenizar 5  $\mu\text{L}$  de sêmen com 5  $\mu\text{L}$  de rosa bengala (1:1 v/v), sobre uma lâmina de microscopia.
- Colocar uma amostra na lâmina e cobrir com lamínula avaliando em microscópio de campo claro em objetiva de 100x com óleo de imersão.
- Avaliar 200 espermatozoides classificando os defeitos morfológicos.

## Avaliações de integridade de membrana plasmática

### Avaliação em microscópio de campo claro: Associação dos corantes Eosina e Nigrosina

Preparo dos corantes eosina e nigrosina

#### Usar

- Eosina Y  $\rightarrow$  1,1 g
- Nigrosina  $\rightarrow$  6,6 g
- Citrato de Sódio  $\rightarrow$  0,5 g
- Água destilada (pH 6,8 a 7,0)  $\rightarrow$  100 mL

#### Procedimento

- Dissolver o citrato de sódio em água destilada.
- Dissolver a nigrosina na solução de citrato de sódio pré-aquecida a 37 °C.
- Adicionar a eosina à solução.
- Homogeneizar a solução que deve apresentar pH variando de 6,7 a 7,0. O pH deve ser ajustado caso seja necessário.
- Deixar 6 a 10 dias incubando antes de usar (armazenar protegido da luz).
- Filtrar a solução com filtro de papel e usar.

#### Procedimento para preparação da amostra

- Colocar 20  $\mu\text{L}$  de sêmen para 20  $\mu\text{L}$  de eosina-nigrosina (1:1 v/v) em lâmina aquecida a 36 °C.
- Fazer o esfregaço, esperar secar e realizar a leitura.

#### Modo de avaliação

- Espermatozoide apresentando a coloração vermelho claro-rosa deve ser considerado morto.
- Espermatozoide branco deve ser considerado vivo.

### Teste hiposmótico

#### Preparo das soluções

#### Usar

- Frutose 150 mOsmol (27,02 g/L): 5,404 g frutose em 200 mL de água destilada.
- Citrato de sódio 150 mOsmol (13,24 g/L): 1,324 g citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

- Armazenar as duas soluções separadas na geladeira.
- A solução hiposmótica (HO) deve ser preparada no momento do uso, adicionando 75 partes (750 µL) da solução de frutose 150 mOsmol e 25 partes (250 µL) da solução de citrato de sódio 150 mOsmol.

#### Procedimento para preparação da amostra

- Homogeneizar 50 µL sêmen para 500 µL da solução hiposmótica.
- Incubar por 50 minutos a 36 °C.
- Colocar 10 µL (1 gota) entre lâmina e lamínula.
- Avaliar 100 espermatozoides em microscopia de contraste de fase.

#### Modo de avaliação

- Espermatozoides que apresentem cauda dobrada ou enrolada devem ser considerados vivos com membrana íntegra.
- Espermatozoides que apresentem cauda reta devem ser considerados mortos com membrana lesada.
- Após classificar as células quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada, o resultado deve ser determinado em porcentagem, realizando o cálculo pela fórmula:
- $HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HO})$ .

### Avaliação em microscópio de epifluorescência: Associação das sondas diacetato de 6-carboxi-fluoresceína (DCF) e iodeto de propídeo (IP)

#### Preparo das soluções estoques

##### Solução 1: Solução estoque de Diacetato de 6-Carboxi-fluoresceína (DCF):

- Diluir 9,2 mg DCF em 20 mL DMSO.
- Armazenar esta solução congelada a -20 °C.

##### Solução 2: Solução estoque de iodeto de propídeo (IP):

- Diluir 10 mg IP em 20 mL solução salina 0,9%.
- Armazenar esta solução congelada a -20 °C.

##### Solução 3: Solução estoque de formaldeído:

###### Usar

- Formalina 40%.
- Solução salina 0,9%.
- Fazer solução com a diluição de 1:80 (formalina: solução salina respectivamente).
- Manter esta solução armazenada a 4 °C.

##### Solução 4: Solução estoque de citrato de sódio 3%:

- Diluir 3 g de citrato de sódio em 100 mL de solução fisiológica 0,9%.
- Manter esta solução armazenada a 4 °C.

### Solução de trabalho

- Preparar no dia da avaliação e permanecer refrigerada a 5 °C.
- Misturar as seguintes quantidades das soluções para compor a solução de trabalho:
  - Solução I: 20 µL
  - Solução II: 10 µL
  - Solução III: 10 µL
  - Solução IV: 960 µL

### Preparo da amostra para leitura

- Homogeneizar 10 µL sêmen com 20 µL da solução de trabalho.
- Incubar a solução de trabalho com a amostra por 8 minutos no banho maria a 36 °C.
- Colocar uma amostra na lâmina (10 µL) e fazer a leitura em filtro de 460-490/420 nm de excitação/emissão, respectivamente.
- Avaliar 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência entre lâmina e lamínula em aumento 1.000x.

### Modo de avaliação

- Espermatozoides corados de vermelho devem ser considerados com membrana lesada.
- Espermatozoides corados de verde devem ser considerados com membrana íntegra.
- Espermatozoides corados de vermelho e verde devem ser considerados com membrana semilesada.

## Avaliações de integridade de acrossoma

### Avaliação em microscópio de campo claro: Associação dos corantes Trypan Blue e Giemsa

#### Solução estoque de Giemsa

- 5 g de Giemsa (Merck).
- 330 mL de glicerol.
- Misturar os reagentes e colocar no banho maria a 50 °C por 1 hora.
- Homogeneizar a solução a cada 15 minutos.
- Manter protegido da luz em vidro âmbar.
- Deixar esfriar e acrescentar 330 mL de metanol novo (garrafa recém-aberta).
- Maturar a solução em frasco âmbar por no mínimo 15 dias à temperatura ambiente antes de usar (agitar o frasco a cada 5 dias).
- Filtrar em papel filtro quando for utilizar e armazenar sem contato com a luz.

#### Solução Giemsa para uso

- Preparar a solução de trabalho no dia do uso.
- Diluir 8 mL de água destilada (pH 6,8 a 7,1) com 4 mL de corante Giemsa estoque.
- Homogeneizar a solução.



### Procedimento para preparação da amostra

- Misturar 40  $\mu\text{L}$  de sêmen com 40  $\mu\text{L}$  do corante Trypan Blue 0,4% (1:1 v/v) (Sigma, T- 8154) em tubo de 1,5 mL.
- Incubar por 15 minutos a 36 °C.
- Fazer 3 esfregaços usando 3  $\mu\text{L}$  a 4  $\mu\text{L}$  da amostra.
- Secar os esfregaços rapidamente em fluxo de ar ou secador.
- Fixar os esfregaços em metanol por 5 minutos e deixar as lâminas secarem.
- Corar os esfregaços por no mínimo 8 horas com a solução de Giemsa uso.
- Lavar lâminas em água corrente e deixar secar para fazer a leitura.
- Avaliar 200 espermatozoides em microscópio de campo claro em aumentos de 400x e 1.000x.

### Modo de avaliação

- Espermatozoides com a cabeça azul e com acrossoma rosa-escuro devem ser considerados mortos com acrossoma íntegro.
- Espermatozoides com a cabeça azul e com acrossoma descorado devem ser considerados mortos com reação acrossomal.
- Espermatozoides com a cabeça rosa clara e com acrossoma rosa-escuro devem ser considerados vivos com acrossoma íntegro.
- Espermatozoides com a cabeça rosa-claro e com acrossoma descorado devem ser considerados vivos com reação acrossomal.

### Avaliação em microscópio de epifluorescência: Associação das sondas Peanut Agglutinin (PNA), Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e Iodeto de Propídeo (IP)

#### Preparo das soluções estoque

##### Solução 1: estoque FITC-PNA - manter em -20 °C

- 1 mg PNA
- 1 mL PBS

##### Solução 2: estoque de iodeto de propídeo (IP) - manter em -20 °C

- 10 mg IP
- 20 mL solução salina 0,9%

##### Solução 3: estoque de formoldeído - manter em 4 °C

- Formalina 40%
- Solução salina 0,9%
- Fazer diluição 1:80

##### Solução 4: estoque de citrato de sódio 3% - manter em 4 °C

- 3 g de citrato de sódio
- 100 mL solução salina 0,9%

### Solução de trabalho

- Preparar no dia da utilização e manter refrigerada em 4 °C
- Solução 1: 20 µL
- Solução 2: 10 µL
- Solução 3: 10 µL
- Solução 4: 960 µL

### Preparo da amostra

- 10 µL sêmen.
- 20 µL da solução de trabalho (este volume pode variar de acordo com a concentração da amostra).
- Incubar 8 minutos no banho Maria a 36 °C.
- Colocar uma gotícula na lâmina (10 µL), cobrir com lamínula e fazer a leitura utilizando filtro de 460-510/460-610 nm de excitação/emissão, respectivamente.
- Contar 200 espermatozoides em aumento de 1.000x.

### Modo de avaliação

- Espermatozoide vivo íntegro: não são observados na fluorescência, apenas em campo claro.
- Espermatozoide vivo íntegro com acrossoma reagido: corado com um contorno verde na região do acrossoma.
- Espermatozoide morto íntegro: corado de vermelho.
- Espermatozoide morto com acrossoma reagido: corado de vermelho com acrossoma corado de verde.

## Avaliações de integridade de DNA com sondas fluorescentes

### Alaranjado de acridine

#### Preparo da solução de alaranjado de acridine

- 20 mg de alaranjado de acridine.
- 100 mL de água milli-Q.
- Estocar em vidro âmbar na geladeira por um mês.

#### Solução de Ácido Cítrico (80 mM/L) e Fosfato Sódico Dibásico (15 mM/L)

- 1,53 g de ácido cítrico (PM=192,13).
- 0,213 g de fosfato sódico dibásico (PM=142).
- 100 mL de água milli-Q.
- Esta solução deve ser fresca e ter o pH ajustado para 2,5.

#### Procedimento para preparação da amostra

- Descongelar as amostras e centrifugar com 2 mL de Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP) para retirada do crioprotetor (700 giros (g) por 3 minutos).
- Lavar 3 vezes com a solução TALP.

- Reconstituir o pellet final com TALP (quantidade suficiente para realizar um bom esfregão da amostra).
- Confeccionar 3 esfregaços de cada amostra e fixá-los por toda a noite em solução de Carnoy fresca (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético).
- Secar os esfregaços.
- Incubar as lâminas preparadas com a solução de ácido cítrico e fosfato sódico dibásico aquecida a 75 °C durante 5 minutos.
- Secar as lâminas.
- Corar com a solução de alaranjado de acridine por 5 minutos em um ambiente escuro.
- Lavar bem a frente da lâmina com jatos de água destilada para retirar todo excesso de corante.
- Selecionar o campo de leitura, colocar uma pequena gota de água destilada, colocar uma lamínula em cima, tirar o excesso da solução com papel toalha e finalmente vedar com esmalte.
- Fazer a leitura imediatamente após a preparação da lâmina em ambiente escuro, utilizando o filtro com comprimento de onda de emissão e excitação de 490 nm/530 nm, respectivamente.
- Contar no mínimo 200 células em aumento de 400x e 1.000x.

#### Modo de avaliação

Considerar os espermatozoides corados de verde como cromatina íntegra e os espermatozoides emitindo cor diferente do verde (amarelo, vermelho ou laranja) como cromatina danificada.

#### Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick end Labeling Assay (Tunel)

##### Preparo das soluções

- Tampão fosfato salino (PBS) - pH 7,1.
- Fração A = fosfato monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ).
- 2,76 g em 100 mL de água destilada.
- Fração B = fosfato dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ ).
- 7,17 g em 100 mL de água destilada.
- Solução final - misturar as frações A e B para obter o pH 7,1 (33 mL da Solução A e 67 mL da Solução B) em temperatura ambiente.

##### Solução de lavagem

- 100 mL de PBS.
- 0,1 g de Albumina sérica bovina (BSA) *fatty acid free*.
- Armazenar a solução na geladeira a 4 °C por uma semana.

##### Solução de DNase (para controle positivo)

- Preparar as alíquotas e armazenar no freezer.
- BSA 400 mM (0,0025 g em 1 mL de PBS) - alíquotas de 5 µL.

- MgCl<sub>2</sub> 50 mM (0,001 g em 1 mL de água destilada) - alíquotas de 6 µL.
- DNase 50 U/mL (0,0001 g em 100 mL de água destilada) - alíquotas de 0,6 µL.

#### **Solução de DNase (para controle positivo) - 50 µL de solução**

- 5 µL de BSA.
- 6 µL de MgCl<sub>2</sub>.
- 0,5 µL de DNase.
- 38,5 µL de água milli-Q.
- A solução deve ser fresca. Preparar e manter no gelo.

#### **Solução Permeabilizadora (15 mL de solução)**

- 75 µL de Triton X - 100 (0,5%).
- 0,015 g de citrato de sódio.
- 14,925 mL de solução de lavagem.
- Armazenar a solução na geladeira (4 °C).

#### **Corante Fluorescente Hoechst 33342 (controle negativo) - 1 mL de solução**

- 1 mg de Hoechst 33342.
- 1 mL de água milli-Q.
- Aliquotar 9 µL e deixar armazenado no freezer.
- Na hora do uso diluir 9 µL em 1,5 mL de PBS.

#### **Paraformaldeído a 10% - 25 mL de solução**

- 2,5 g de paraformaldeído.
- 1 a 2 gotas de NaOH (8M).
- 25 mL de água milli-Q.

#### **Orientações de Preparo**

- Adicionar 2,5 g de formaldeído em 12 mL de água milli-Q aquecida a 60 °C e homogeneizar.
- Pingar 1 a 2 gotas de NaOH (8M) e verificar a mudança de cor, deve ficar translúcido.
- Completar com água milli-Q até 25 mL.

#### **Paraformaldeído a 4% (Diluição final) - 10 mL de solução**

- 4 mL de paraformaldeído a 10%.
- 2 mL de PBS.
- 4 mL de água milli-Q.

#### **Solução de Reação Tunel (Roche Germany -11684795910-)**

- 500 µL de solução.
- 50 µL de solução enzimática.
- 450 µL de solução label (tampão).
- Misturar bem e manter no gelo e no escuro.

### Procedimento para preparação da amostra

- Descongelar a amostra de sêmen (usar 0,5 mL de sêmen fresco ou congelado).
- Centrifugar o sêmen a 700 giros (g) por 5 minutos (2x) em 1 mL de solução de lavagem a 37 °C.
- Ressuspender o pellet com 1 mL de paraformaldeído 4% e incubar por 1 hora à temperatura ambiente.
- Adicionar 1 mL de solução de lavagem a 37 °C e centrifugar a 700 giros (g) por 5 minutos.
- Diluir o pellet com solução permeabilizadora e incubar por 1 hora a 4 °C (geladeira).
- Adicionar 1 mL de solução de lavagem a 37 °C e centrifugar a 700 giros (g) por 5 minutos.
- Diluir com 50 µL solução de lavagem.

### Fazer

- Controle negativo: 10 µL de amostra com 50 µL da solução label (não colocar a solução de reação do Tunel) - incubar por 20 minutos à temperatura ambiente.
- Controle positivo: 10 µL da amostra e 20 µL de DNase - incubar por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionar 30 µL da solução de reação do Tunel.
- Amostra teste: 30 µL da amostra com 30 µL da solução Tunel.
- Incubar as amostras por 1 hora a 37 °C no escuro em uma câmara úmida (recipiente fechado, encapado com papel alumínio com água a 37 °C).
- Adicionar 1 mL de solução de lavagem a 37 °C (nas 3 amostras) e centrifugar a 700 giros (g) por 5 minutos.
- Contra-corar as amostras com Hoechst - 40 µL por 30 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugar a 700 giros (g) por 5 minutos.
- Ressuspender com 30 µL de solução de lavagem.
- Preparar a lâmina (10 µL da amostra) - a lamínula pode ser vedada com esmalte nas bordas.
- Analisar em microscópio de epifluorescência com filtro de comprimento de onda para Hoechst com excitação de 365 nm e emissão de 420 nm e Isotiocianato de fluoresceína (FITC) - excitação de 450 nm e emissão de 515 nm.

### Modo de avaliação

#### Amostra teste

- Tunel positivo (DNA fragmentado) - corado de verde.
- Tunel negativo (DNA íntegro) - corado de azul.

#### Controle positivo

- Todos os espermatozoides com Tunel positivo - a DNase rompe o DNA e todos são corados de verde.

#### Controle negativo

- Todos os espermatozoides com Tunel negativo (íntegros) - sem ação da DNase e são corados de azul.

## Teste para capacitação espermática: hidrocloreto de clortetraciclina (CTC)

### Preparo das soluções

- Solução de 1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] Octane, DABCO: 0,22 M.
- 10 mL de PBS pH 7,4.
- 0,247 g de DABCO (Sigma D2522).
- Aliquotar em volumes de 60 µL e conservar a -20 °C.

### Solução de glutaraldeído (50%) em TRIS (2,5M)

- 0,302 g de trizma base.
- 1 mL de água milli Q.
- 1 mL de solução de glutaraldeído.
- Preparar diariamente.

### Solução estoque de TRIS-NaCl : 20 mM/130 mM. pH 7,8

- 1,21 g de Trizma base.
- 3,8 g de NaCl.
- 500 mL de água milli-Q.
- Aliquotar em volumes de 10 mL e conservar a -20 °C.

### Solução de trabalho de CTC

- 10 mL de solução estoque de TRIS-NaCl.
- 0,0038 g de CTC.
- 0,0088 g de L-Cisteína.
- Preparar diariamente a solução de trabalho e estocar a 4 °C protegido da luz.
- Diluir uma amostra de sêmen (10 µL) em uma solução de corante de CTC (15 µL), preparada de acordo como descrito abaixo:
- Colocar uma alíquota de 10 µL de solução de corante com sêmen sobre uma lâmina e cobrir com uma lamínula.
- Manter a amostra em caixa lacrada contendo água para manter a umidade, protegida da luz, à temperatura de 4 °C por aproximadamente 4 a 5 horas.
- Fazer leitura de 200 células espermáticas em microscópio de epifluorescência com filtro de comprimento de onda de 494/517 de excitação/emissão, respectivamente em aumentos de 200x e 400x.

### Modo de avaliação

- Espermatozoides que apresentarem fluorescência brilhante em toda a cabeça: padrão não capacitado.
- Espermatozoides que apresentarem ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal: padrão capacitado.
- Espermatozoides que apresentarem ausência ou baixa fluorescência na cabeça, com um anel fluorescente na região equatorial: padrão reagido.

## Teste de ligação a zona pelúcida (ZP)

Para este teste, utilizar ovócitos imaturos, ovócitos maturados in vitro ou ovócitos imaturos obtidos de ovários refrigerados.

### Preparação dos ovócitos imaturos refrigerados

- Coletar ovários em abatedouro e transportar em PBS estéril.
- No laboratório lavar os ovários e armazenar em PBS a 4 °C durante 24 horas.
- Aspirar os folículos de 3 mm a 6 mm de diâmetro.
- Selecionar os ovócitos com mais de 3 camadas de células do cumulus e citoplasma uniforme.
- Passar os ovócitos no vortex em PBS suplementado com 10% de soro fetal bovinos (SFB) por 4 minutos para retirar as células do cumulus.

### Preparação do sêmen e incubação

- Descongelar uma palheta de sêmen.
- Colocar em um tubo de centrífuga 15 mL.
- Acrescentar 5 mL de PBS e centrifugar duas vezes a 300 giros (g) por 15 minutos.
- Retirar o sobrenadante e diluir o pellet com 250 µL a 500 µL de meio Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP).
- Avaliar a motilidade e a concentração.  
Observação: Os espermatozoides podem ser pré-incubados com Hoechst ou não.
- Adicionar na placa 10 gotas de 10 µL da solução contendo  $1 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL e cobri-las com óleo mineral ou de silicone.
- Adicionar um ovócito em cada gota e incubar espermatozoides/ovócitos por 4 horas a 38,5 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>.
- Após a coincubação lavar de 7 a 10 vezes cada ovócito em meio TALP para remoção dos espermatozoides fracamente ligados à ZP.
- Colocar ovócitos entre lâmina e lamínula e fazer a contagem dos espermatozoides ligados à ZP em microscopia de contraste de fase.
- Para a leitura, também pode-se colocar os ovócitos após a lavagem em uma solução de iodeto de propídeo e avaliar em microscópio de epifluorescência.

### Meio Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP)

- 5,772 g de NaCl
- 0,231 g de KCl
- 0,042 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,294 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O
- 0,223 g de MgCl<sub>2</sub>
- 3,700 mL de Lactic Acid (Na-Salt)
- 2,603 g de Hepes (Na-Salt)
- 2,100 g de NaHCO<sub>3</sub>
- 998 mL de H<sub>2</sub>O

## Teste de fecundação com coloração lacmoide

- Fazer fecundação in vitro dos ovócitos previamente maturados in vitro.
- Após 12 a 18 horas de fecundação, desnudar completamente os possíveis zigotos com o auxílio de uma pipeta de 200 µL.
- Colocar os zigotos em solução fixadora de etanol e ácido acético (3:1 v/v), mantendo-os na solução por no mínimo 24 horas.
- Colocar os zigotos sobre uma lâmina coberta por uma lamínula sustentada por parafina nas laterais, evitando que a lamínula rompa os zigotos.
- Lavar os zigotos com solução de lacmoide 1% em ácido acético glacial 45% por 30 segundos.
- Retirar o excesso de corante lavando os zigotos com solução fixadora de etanol e ácido acético (3:1 v/v).
- Fazer leitura dos zigotos fecundados em microscópio ótico com aumento de 1.000 x.

### Modo de avaliação

- Considerar fecundados todas as estruturas que apresentarem: presença de cromatina feminina e de espermatozoides no citoplasma, cabeça descondensada, dois ou mais pró-núcleos ou primeira divisão celular.

### Preparo das soluções

- 1 g de lacmoide.
- 45 mL de ácido acético 100 mL de água milli-Q.
- Filtrar a solução em filtro de papel.



# Capítulo 3

## Atlas Microfotográfico

Antônio Emídio Dias Feliciano Silva; Carlos Frederico Martins;  
Carolina Gonzales da Silva; Elisa Ribeiro da Cunha; José de Oliveira  
Carvalho; Margot Alves Nunes Dode

A seguir, serão apresentadas figuras de espermatozoides que auxiliarão na avaliação do sêmen congelado pelo veterinário de campo ou na pesquisa laboratorial. As imagens estão divididas em espermatozoides normais (Figuras 1 a 7), defeitos de cabeça espermática (Figuras 8 a 44), defeitos de peça intermediária (Figuras 45 a 62), defeitos de cauda espermática (Figuras 63 a 81), outros elementos (Figuras 82 a 83) e avaliações espermáticas complementares (Figuras 84 a 121).

### Espermatozoides Normais

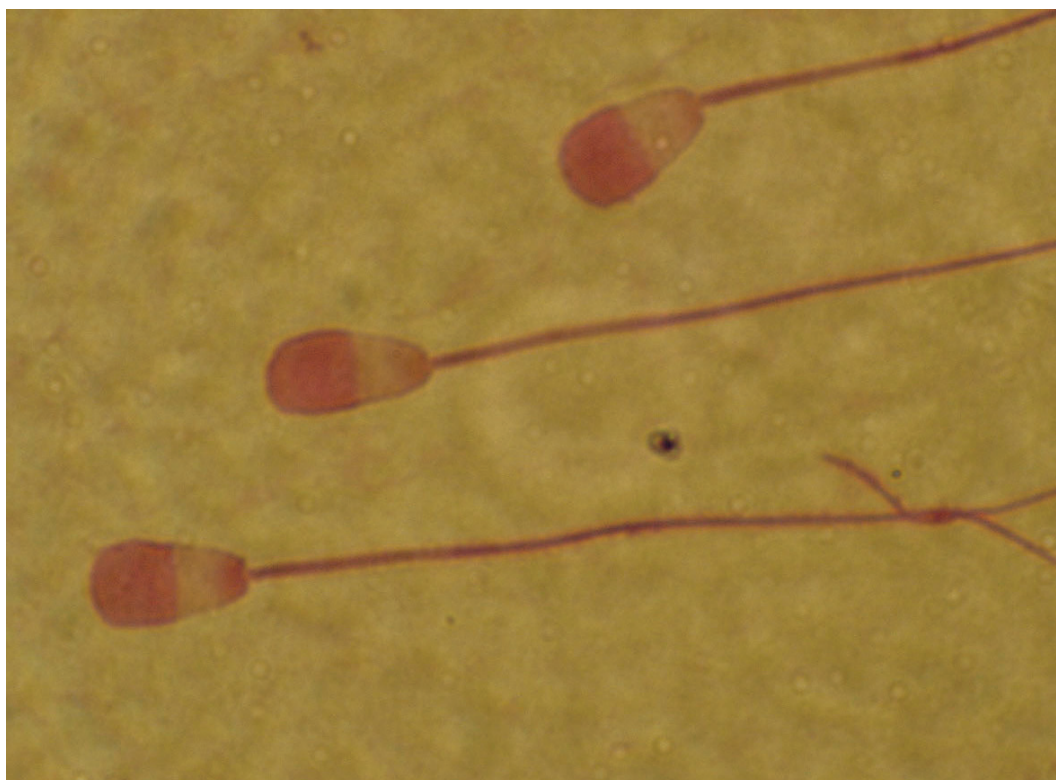


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 1.** Espermatozoides normais corados com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumentado de mil vezes).

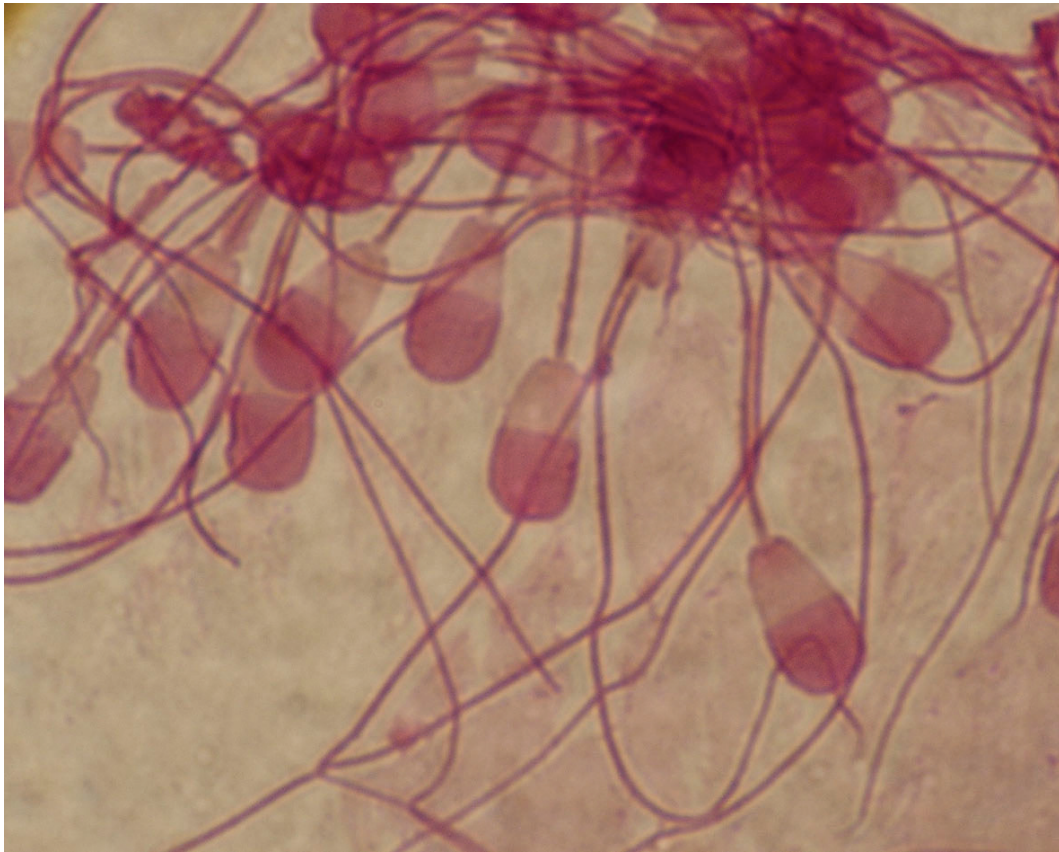


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 2.** Aglomerado de espermatozoides normais corados com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

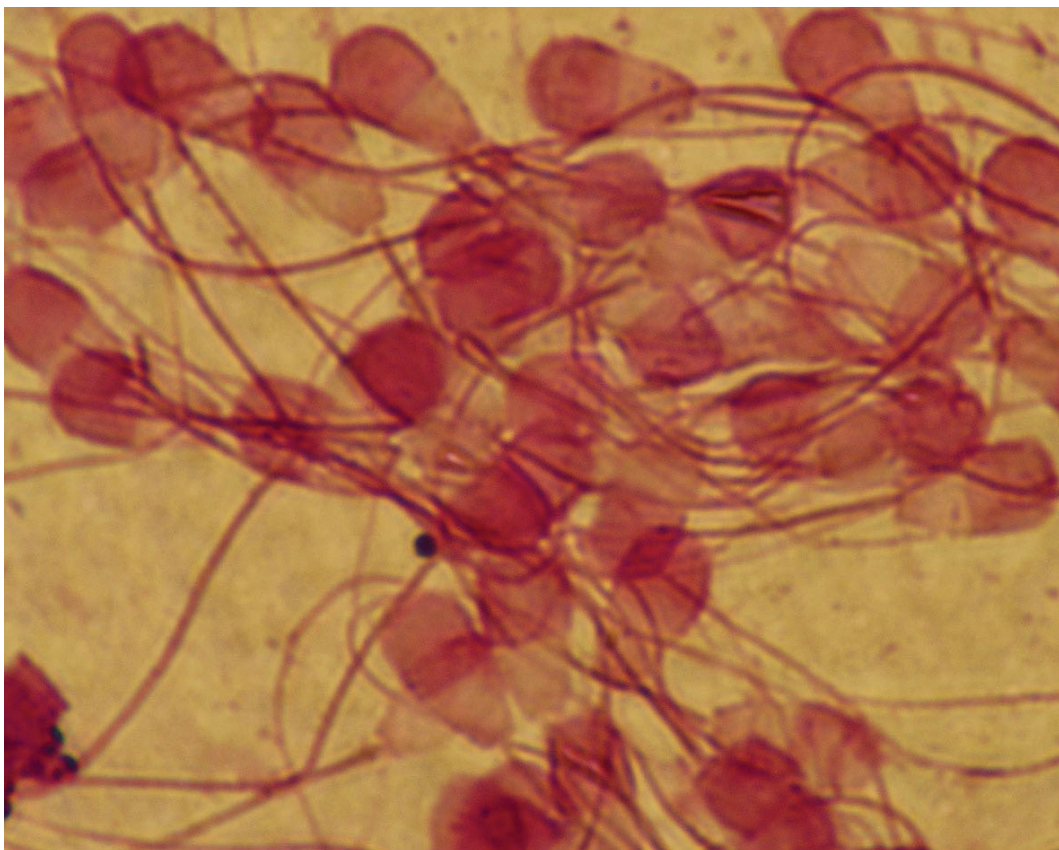


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 3.** Aglomerado de espermatozoides normais corados com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

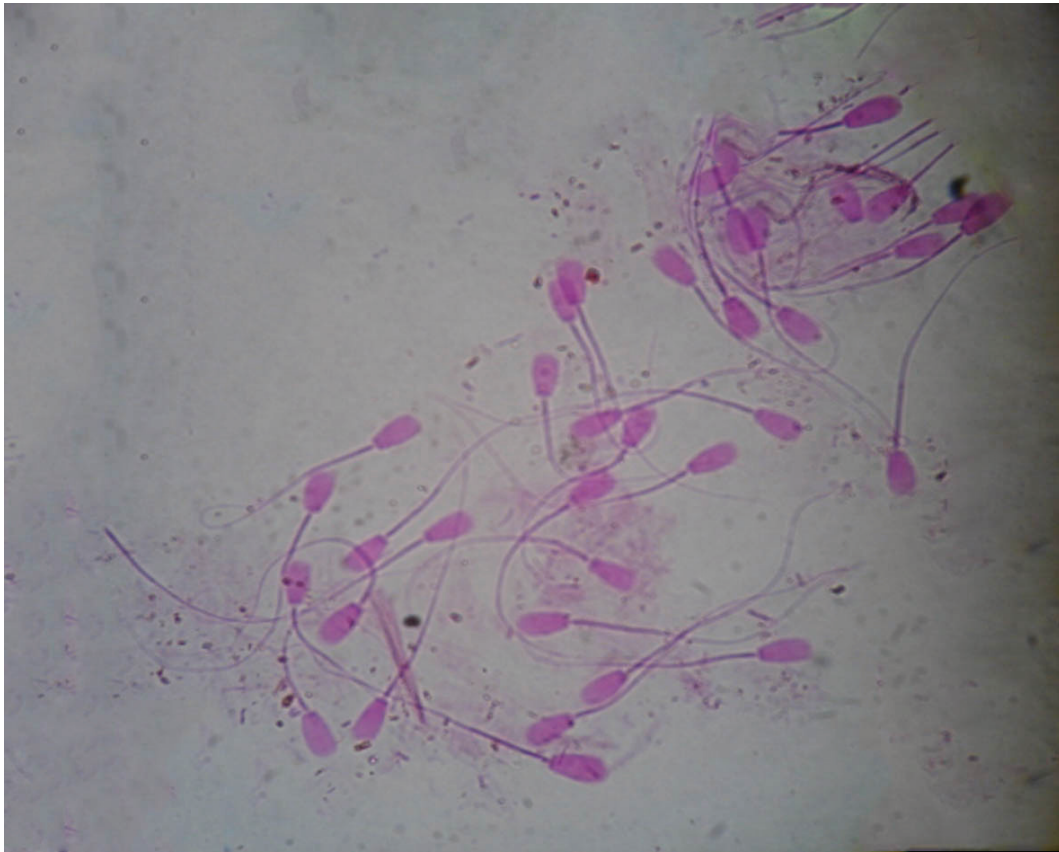


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 4.** Espermatozoides normais corados com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).

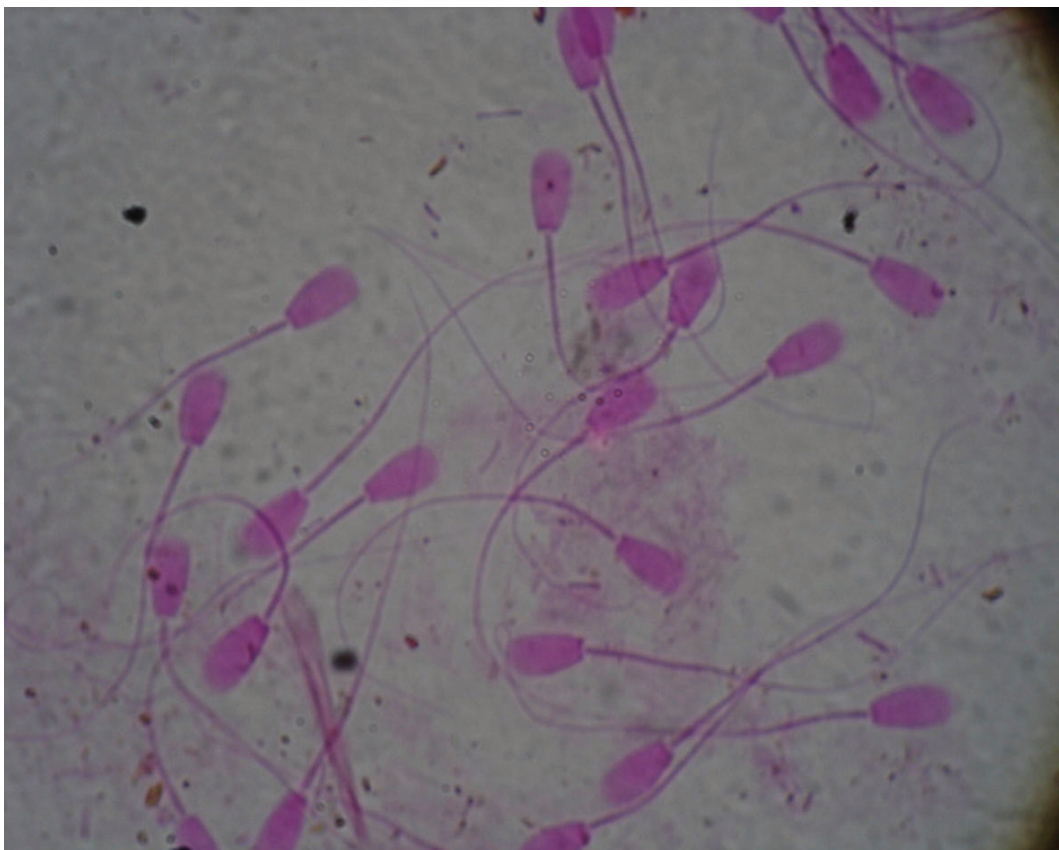


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 5.** Espermatozoides normais corados com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 6.** Espermatozoides normais com cabeças aglutinadas. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

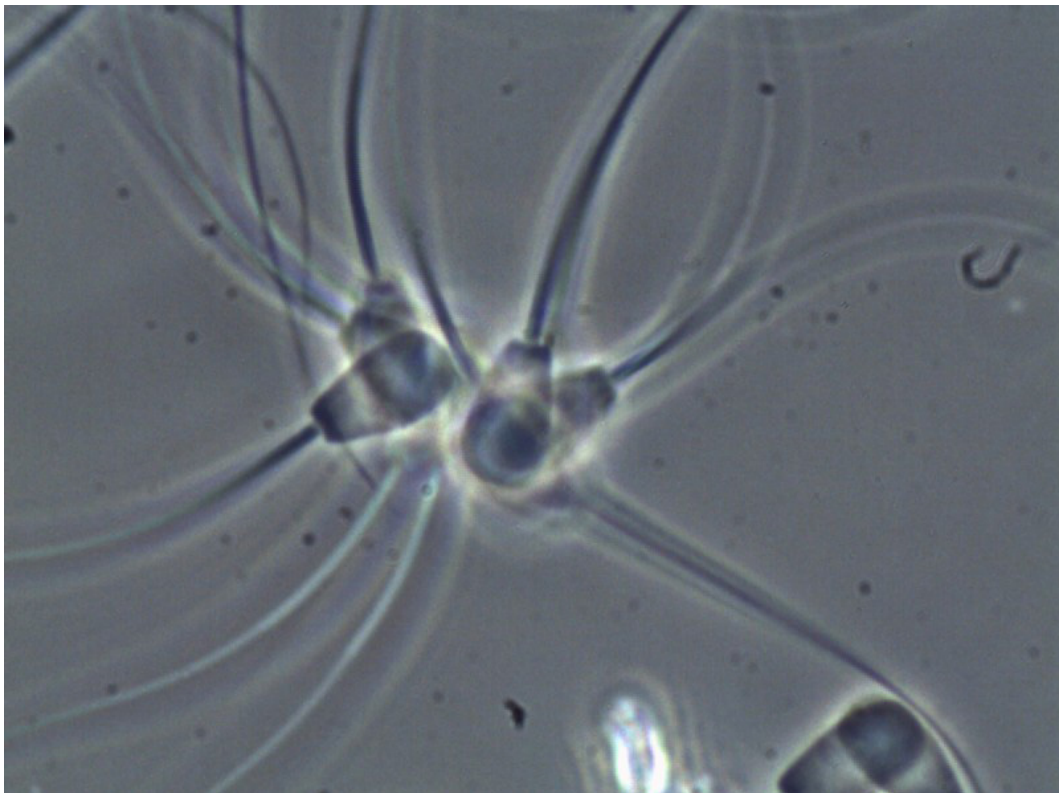


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 7.** Espermatozoides normais com cabeças aglutinadas. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

## Defeitos de Cabeça Espermática



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 8.** Espermatozoide macrocefálico (seta preta) ao lado de um espermatozoide com peça intermediária (seta branca) . Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 9.** Espermatozoide com acrossoma rugoso corado com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: Carolina Gonzales da Silva

**Figura 10.** Espermatozoide gigante no meio de vários normais. Observar a desproporcionalidade de tamanho de toda estrutura espermática. Microscopia de contraste de fase (aumento de cem vezes).

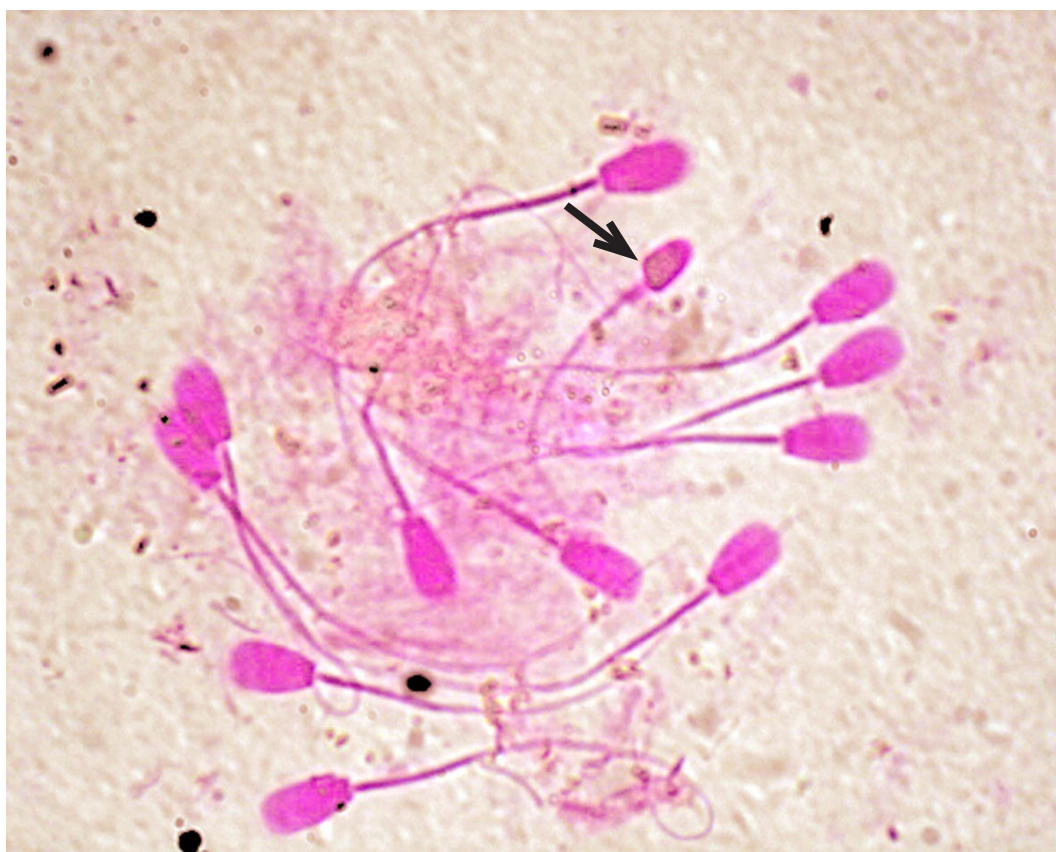


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 11.** Espermatozoide microcéfálico (seta). Coloração com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).

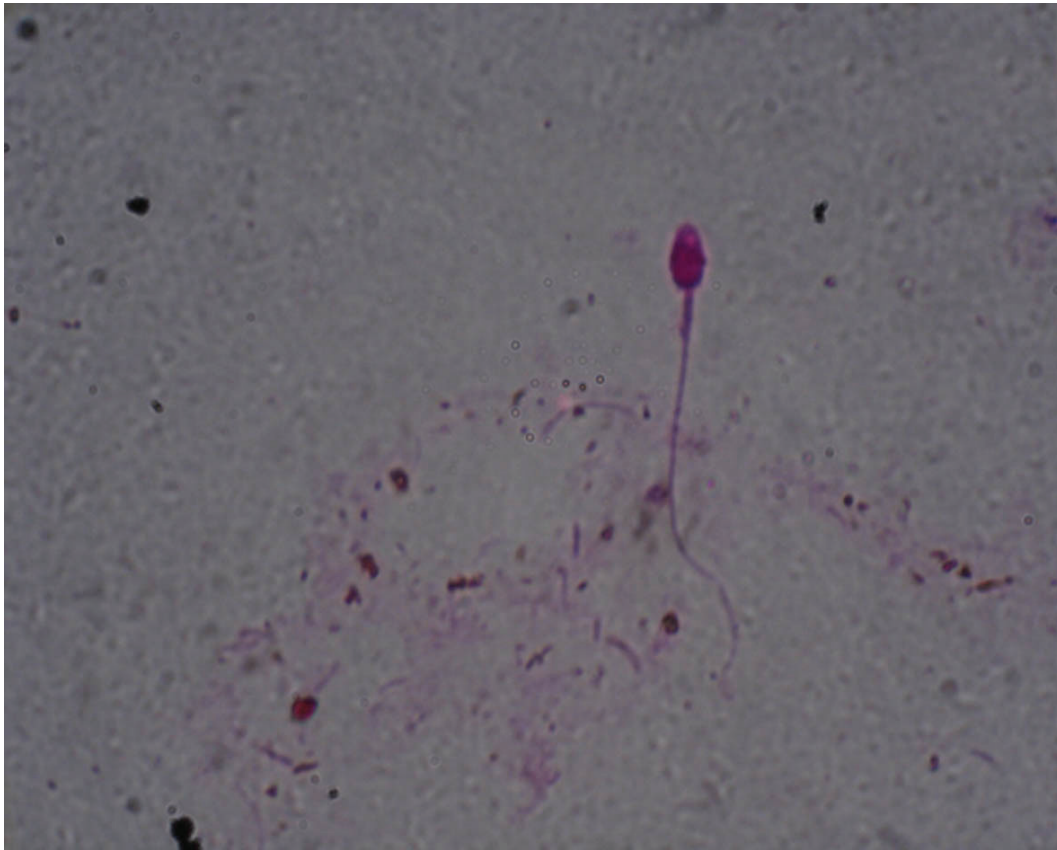


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 12.** Espermatozoide microcéfálico. Coloração com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).

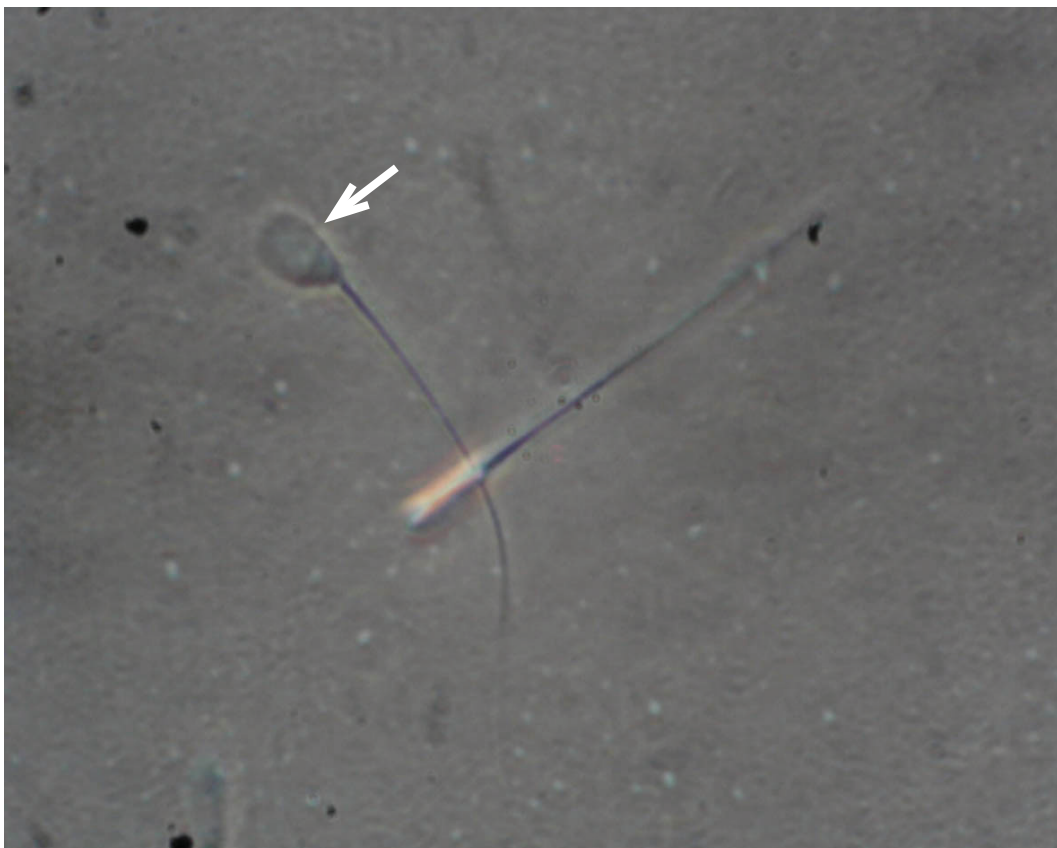


Foto: Carolina Gonzales da Silva

**Figura 13.** Espermatozoide com formato de cabeça anormal (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 14.** Espermatozoide com cabeça piriforme (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 15.** Espermatozoide com forma teratológica (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).





Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 16.** Espermatozoide com forma teratológica. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

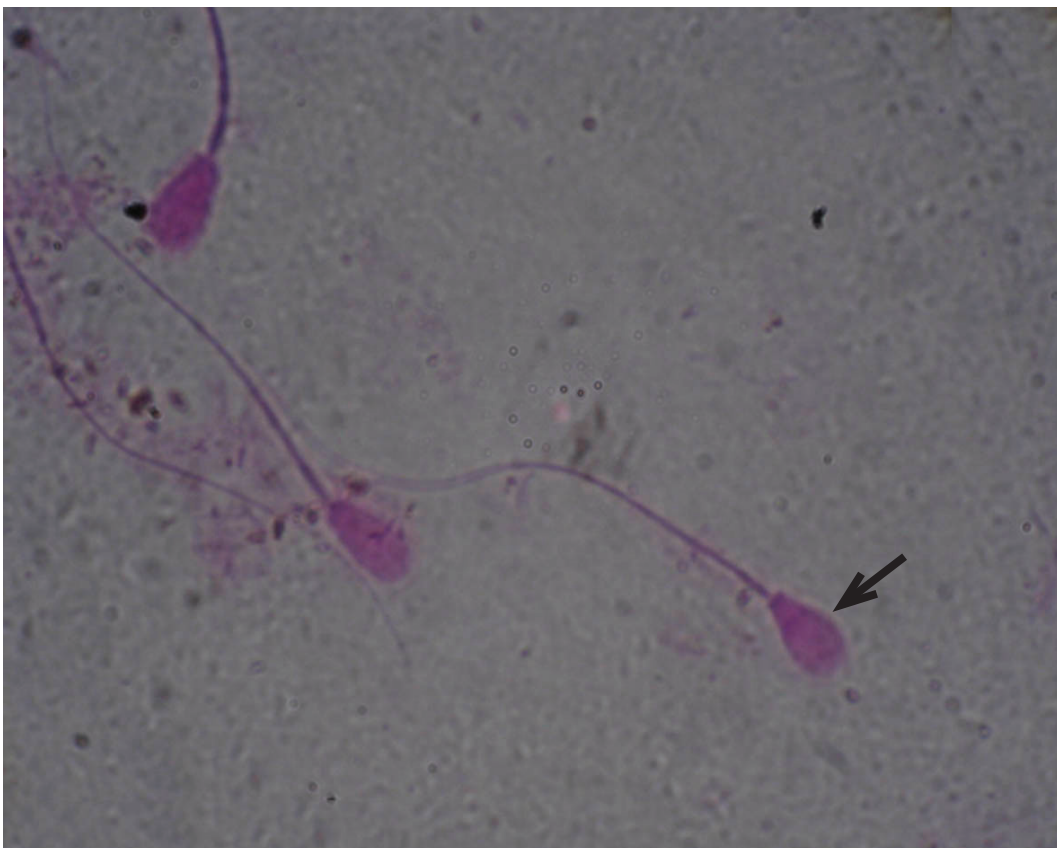


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 17.** Espermatozoide com cabeça piriforme (seta). Coloração com rosa bengala (aumento de quatrocentas vezes).

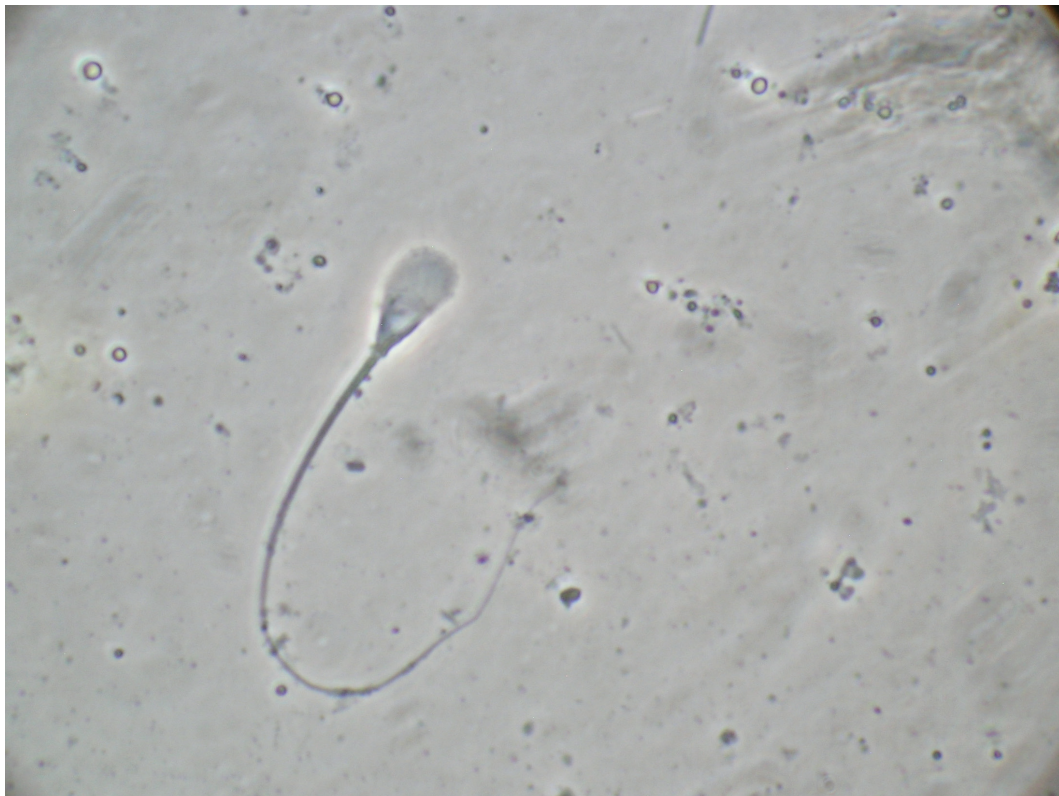


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 18.** Espermatozoide estreito na base. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

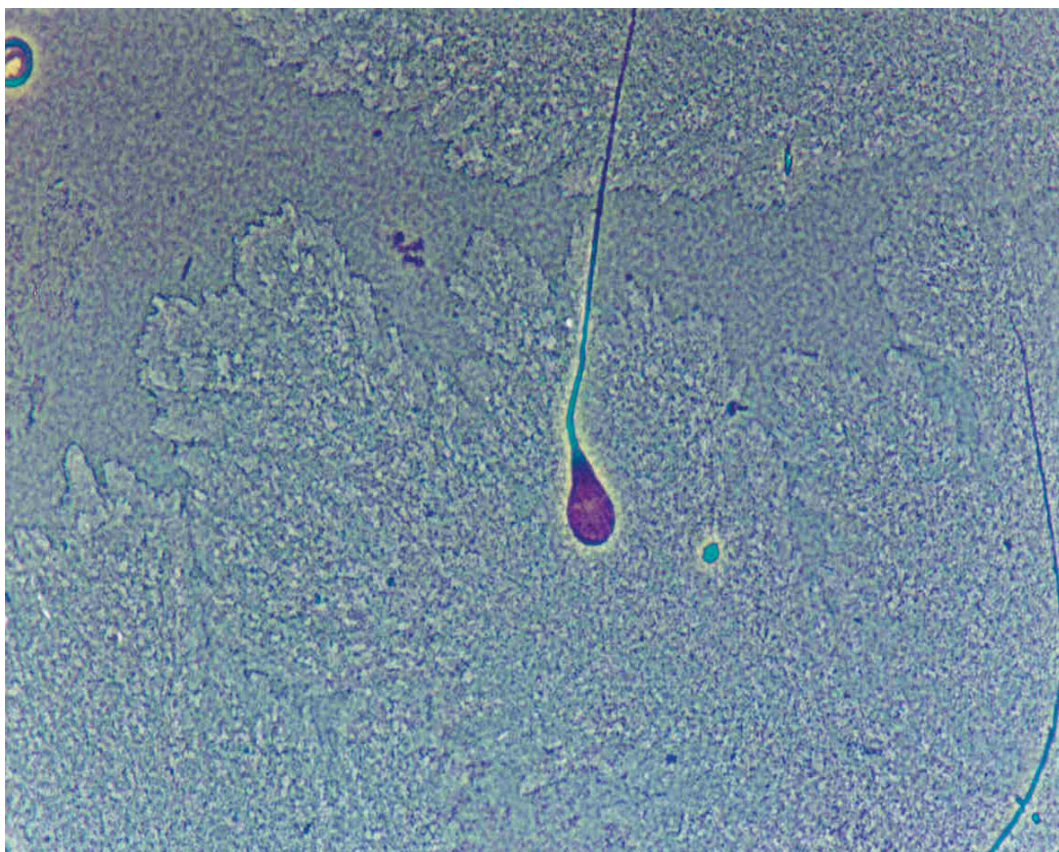


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 19.** Espermatozoide com cabeça piriforme corado com Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).

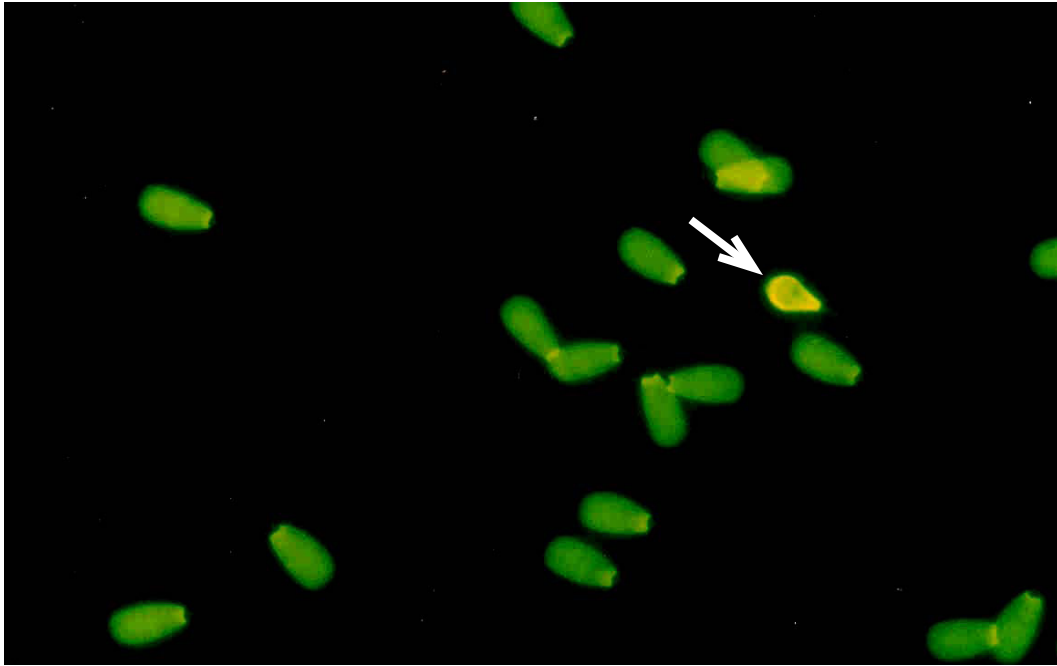


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 20.** Espermatozoide com cabeça piriforme (seta) corado com alaranjado de acridine. Microscopia de epifluorescência (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 21.** Espermatozoide com cabeça estreita na base. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 22.** Espermatozoide com cabeça estreita na base (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 23.** Espermatozoide com cabeça estreita na base (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Doce

**Figura 24.** Espermatozoide com formato de cabeça anormal (seta preta) e presença de gota citoplasmática distal (seta branca). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

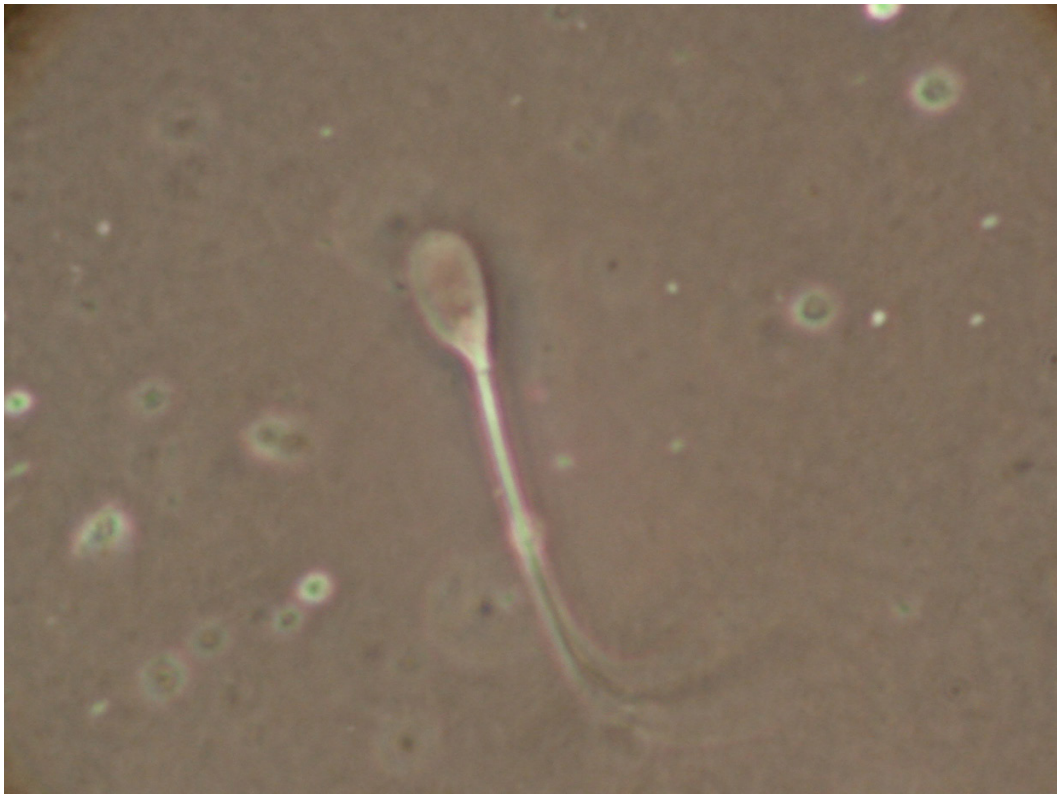


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 25.** Espermatozoide apresentando estreitamento na base. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 26.** Espermatozoide com cratera (seta branca) e gota citoplasmática distal (seta preta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 27.** Espermatozoide com cratera (seta branca) e cauda fortemente enrolada (seta preta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 28.** Espermatozoide com cabeça estreita na base (seta preta) e cauda fortemente dobrada com gota citoplasmática distal (seta branca). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 29.** Espermatozoide com acrossoma com *knobbed sperm* (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Doce

**Figura 30.** Espermatozoide com acrossoma com *knobbed sperm* (seta) e gota citoplasmática proximal. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 31.** Espermatozoide com acrossoma com *knobbed sperm* (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



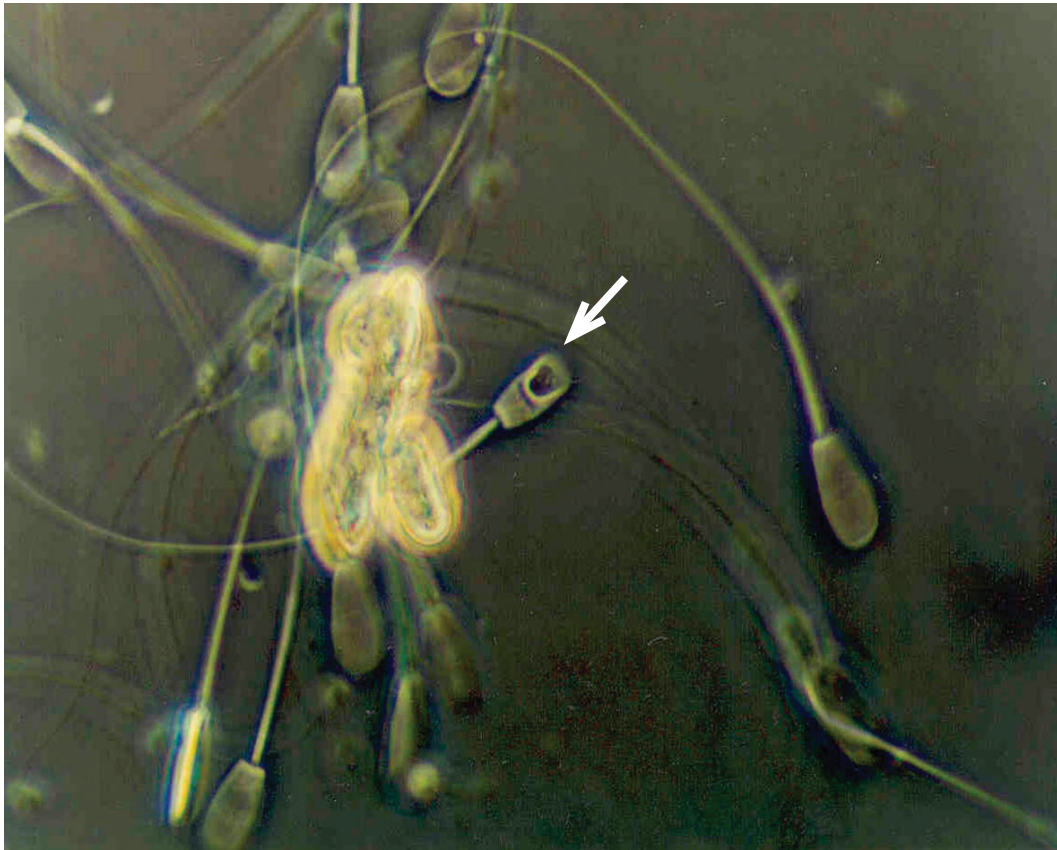


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 32.** Espermatozoide com cratera na cabeça (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

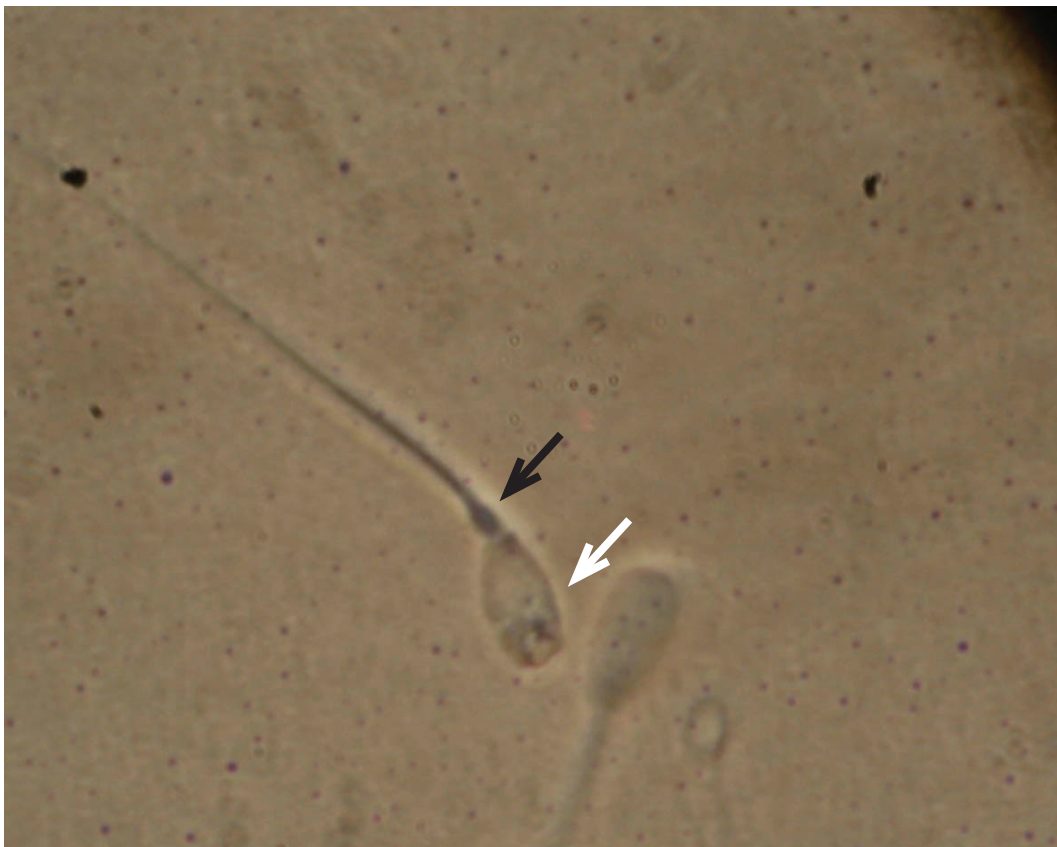


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 33.** Espermatozoide com acrossoma vacúolos (seta branca) e gota citoplasmática proximal na peça Intermediária (seta preta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 34.** Espermatozoide com contorno anormal na cabeça (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

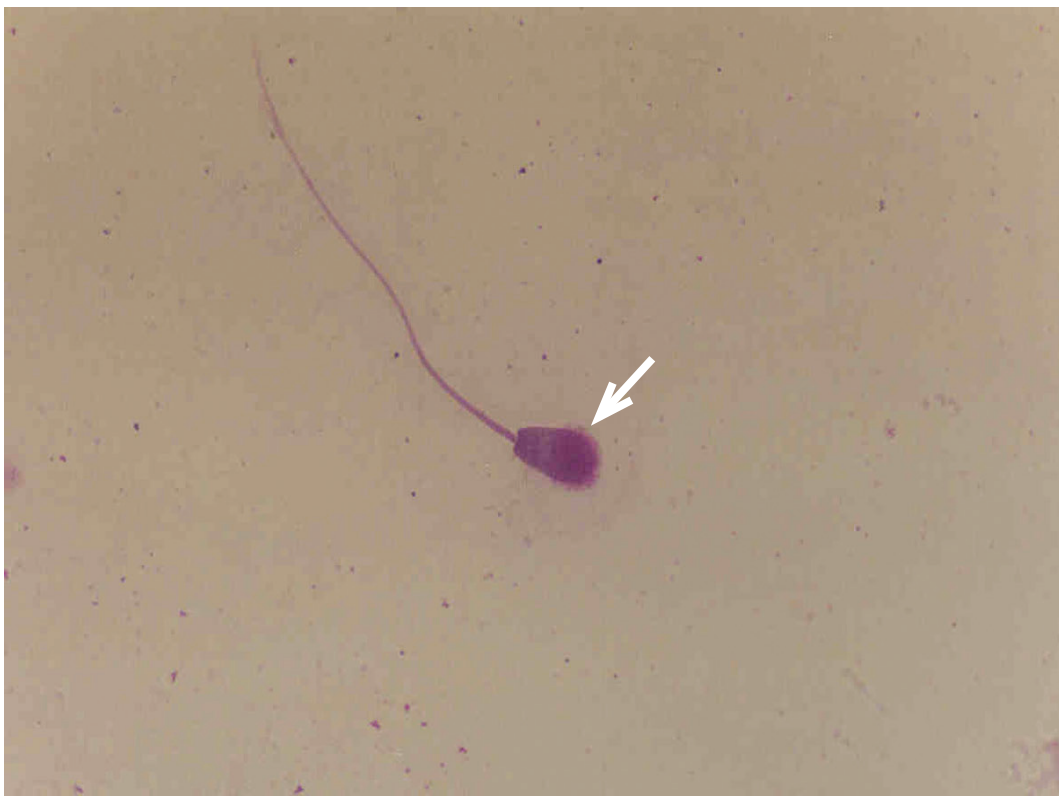


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 35.** Espermatozoide com acrossoma rugoso (seta). Coloração com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

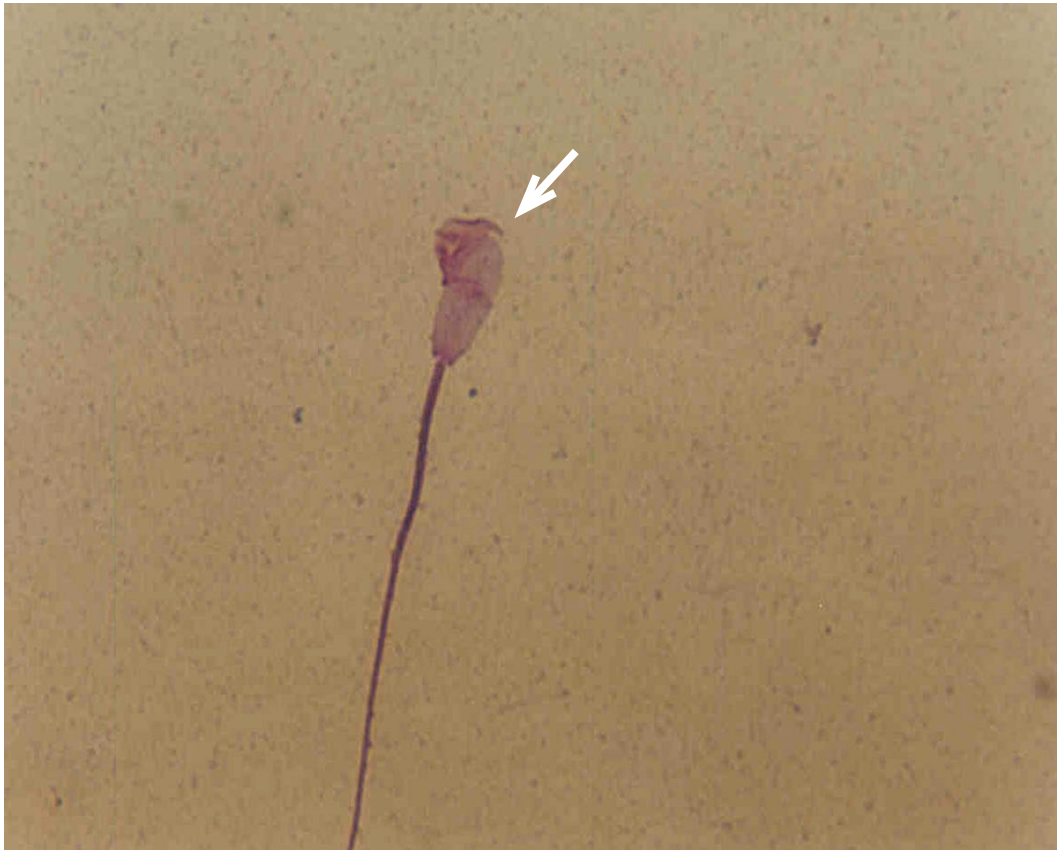


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 36.** Espermatozoide com acrossoma destacado (seta). Coloração com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 37.** Espermatozoides com *Pouch formation* (setas). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 38.** Espermatozoide com cabeça isolada normal (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

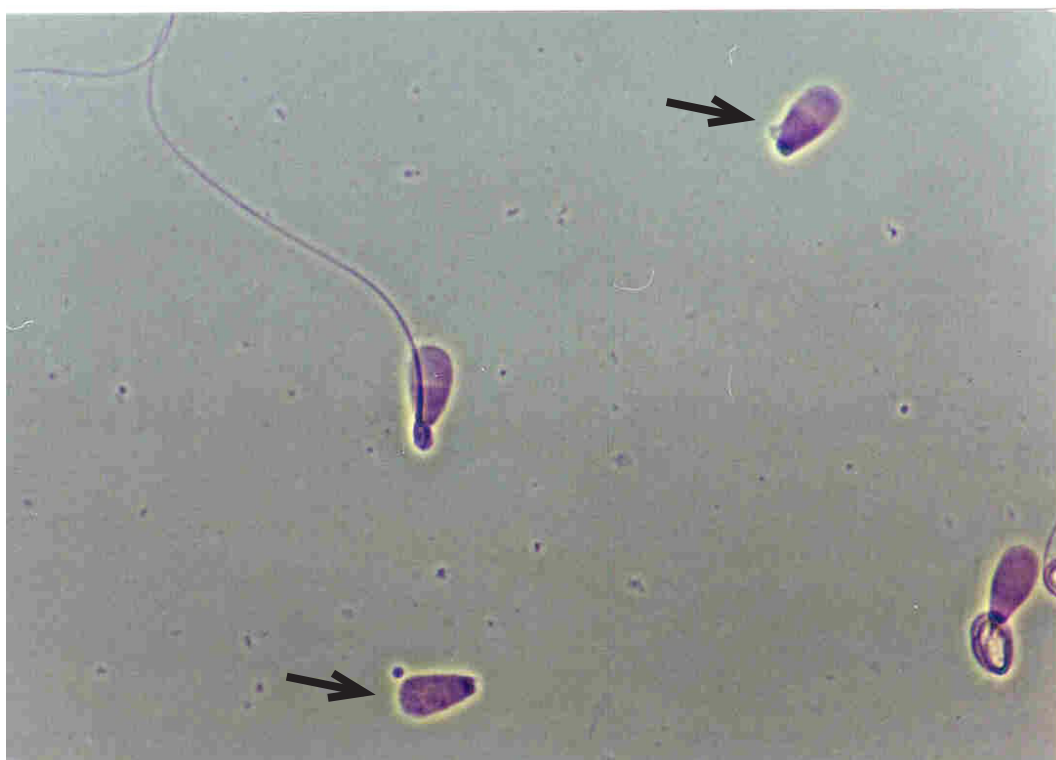


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 39.** Espermatozoides com cabeças isoladas (setas) coradas com Giemsa. Microscopia de contraste de fase (aumento de duzentas vezes).

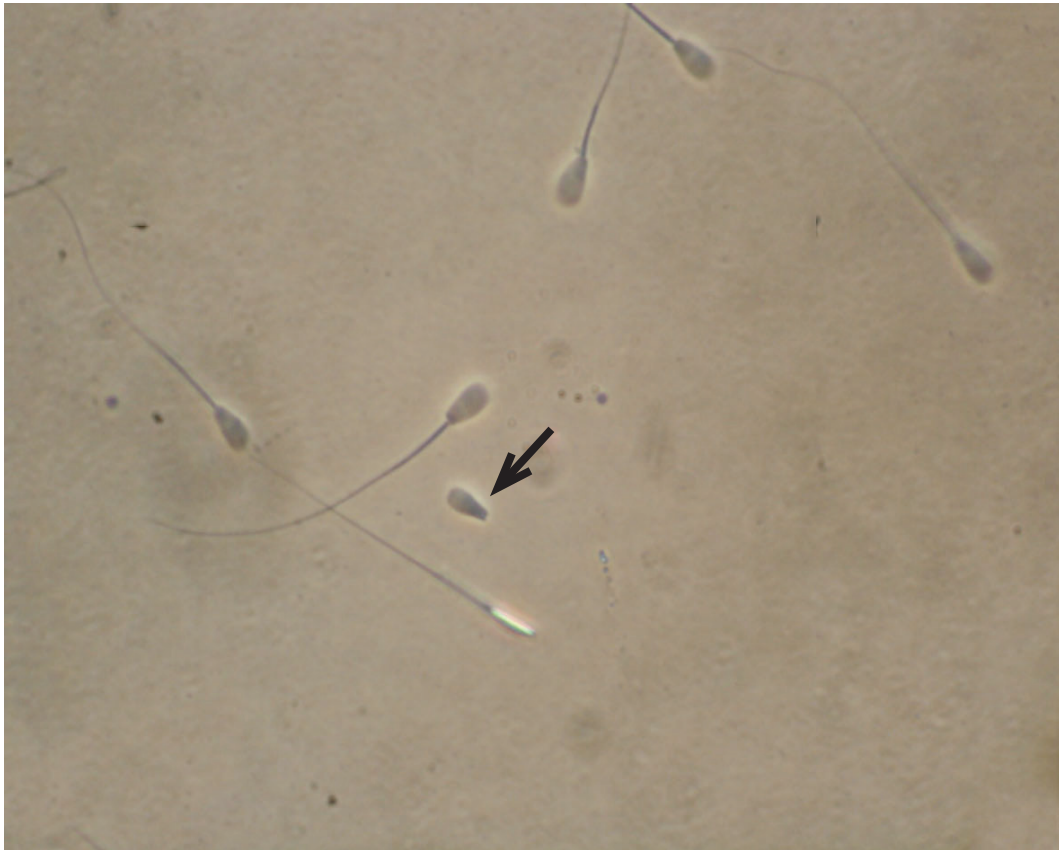


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 40.** Espermatozoide com cabeça isolada patológica (piriforme, seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de cem vezes).

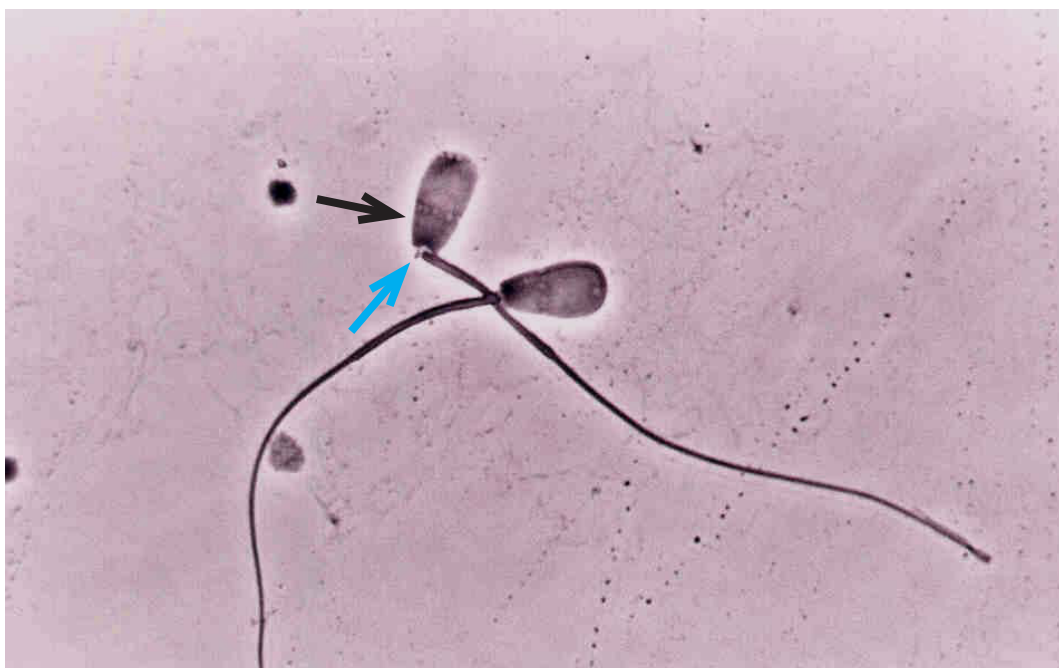


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 41.** Espermatozoides com *Pouch formation* (seta preta) e fratura de peça intermediária (seta azul). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 42.** Espermatozoide com cabeça dupla (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 43.** Espermatozoide com cabeça dupla. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 44.** Espermatozoide com cabeça dupla. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

## Defeitos de Peça Intermediária



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 45.** Espermatozoide com espessamento de peça intermediária, gota citoplasmática proximal e base estreita (seta). Coloração com rosa bengala (aumento de mil vezes).

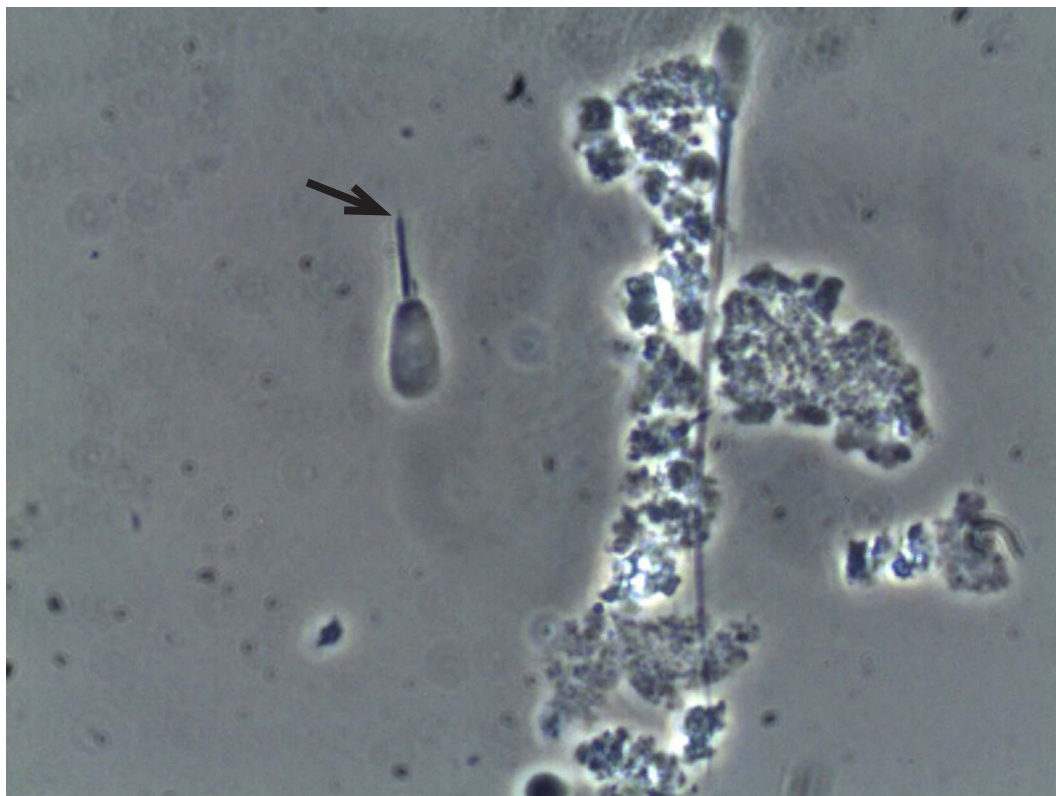


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 46.** Espermatozoide com fratura de peça intermediária (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).





Foto: Margot Alves Nunes Doce

**Figura 47.** Espermatozoide com fratura de peça intermediária (seta preta) e espermatozoide com cabeça isolada normal (seta branca). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 48.** Espermatozoide com fratura de peça intermediária (seta). Coloração com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 49.** Espermatozoide com peça intermediária fibrilar (seta) . Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 50.** Espermatozoide com peça intermediária fibrilar. Coloração com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).

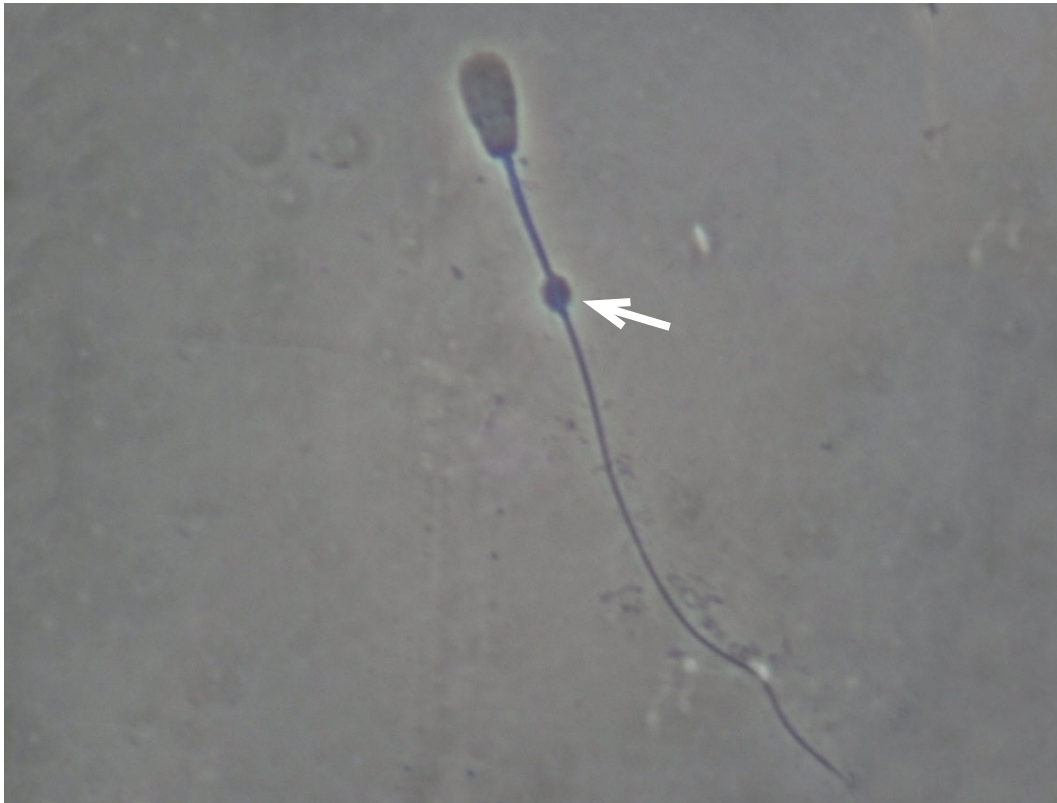


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 51.** Espermatozoide com gota citoplasmática distal. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

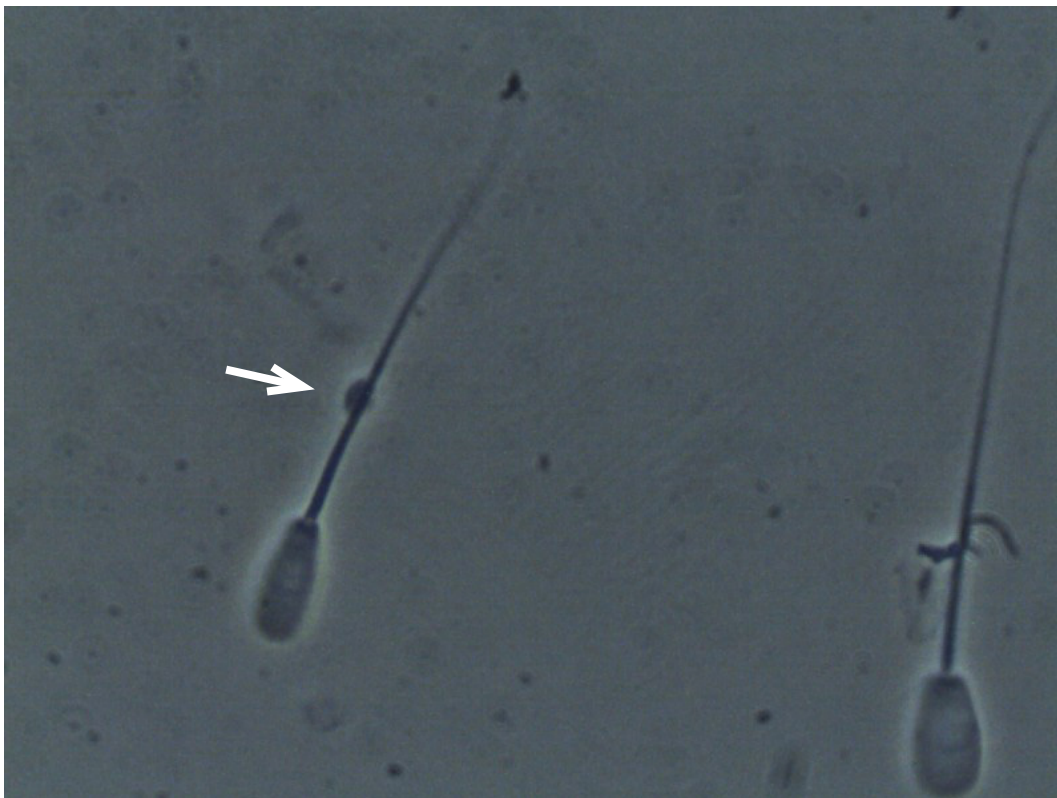


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 52.** Espermatozoide com gota citoplasmática distal na peça intermediária (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 53.** Espermatozoide com gota citoplasmática na porção proximal (seta) da peça intermediária. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 54.** Espermatozoide com gota citoplasmática proximal (seta) na peça intermediária. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

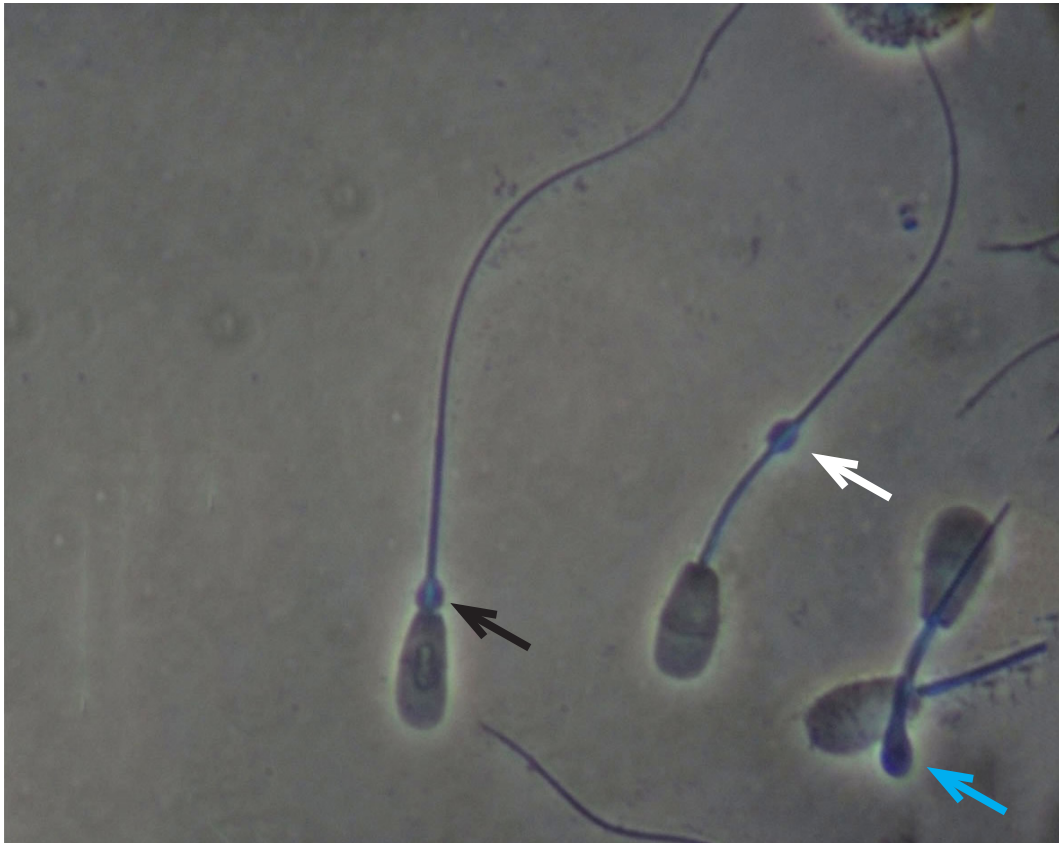


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 55.** Espermatozoide com gota citoplasmática proximal (seta preta) e gota citoplasmática distal (seta branca) na peça intermediária e cauda dobrada com gota citoplasmática (seta azul). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 56.** Espermatozoide com inserção de peça intermediária abaxial (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de duzentas vezes).

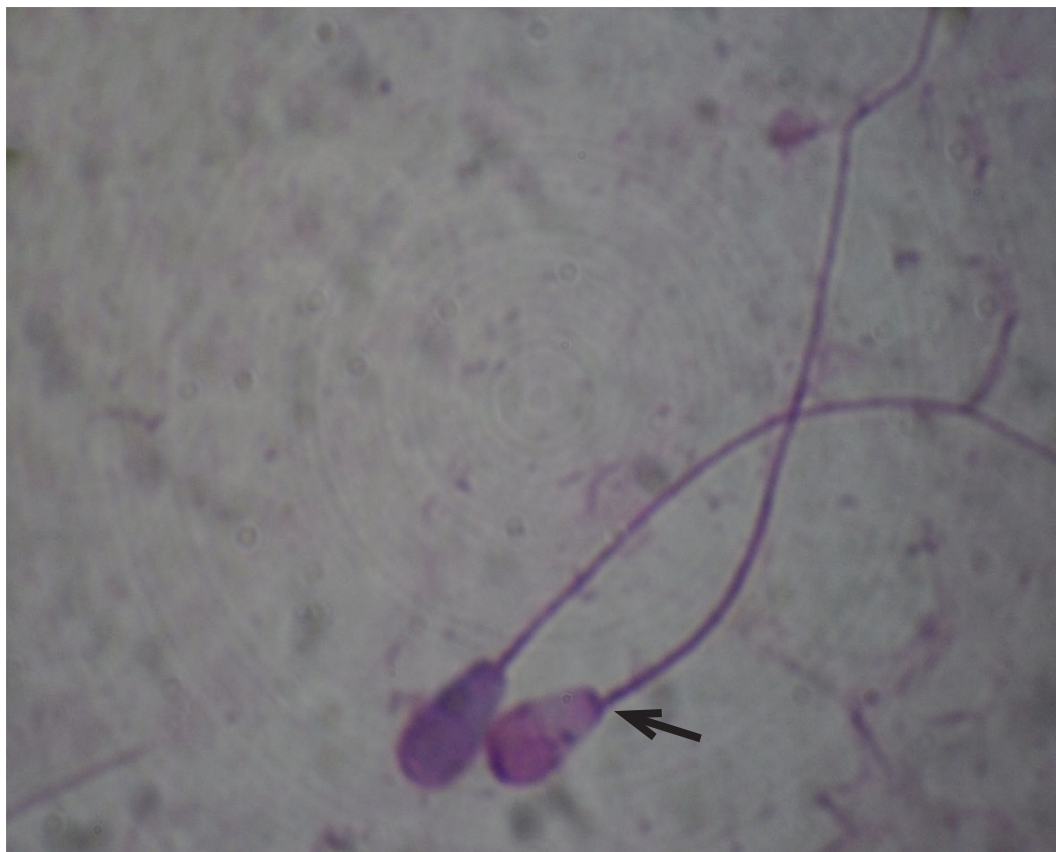


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 57.** Espermatozoide com inserção de peça intermediária abaxial (seta). Coloração com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

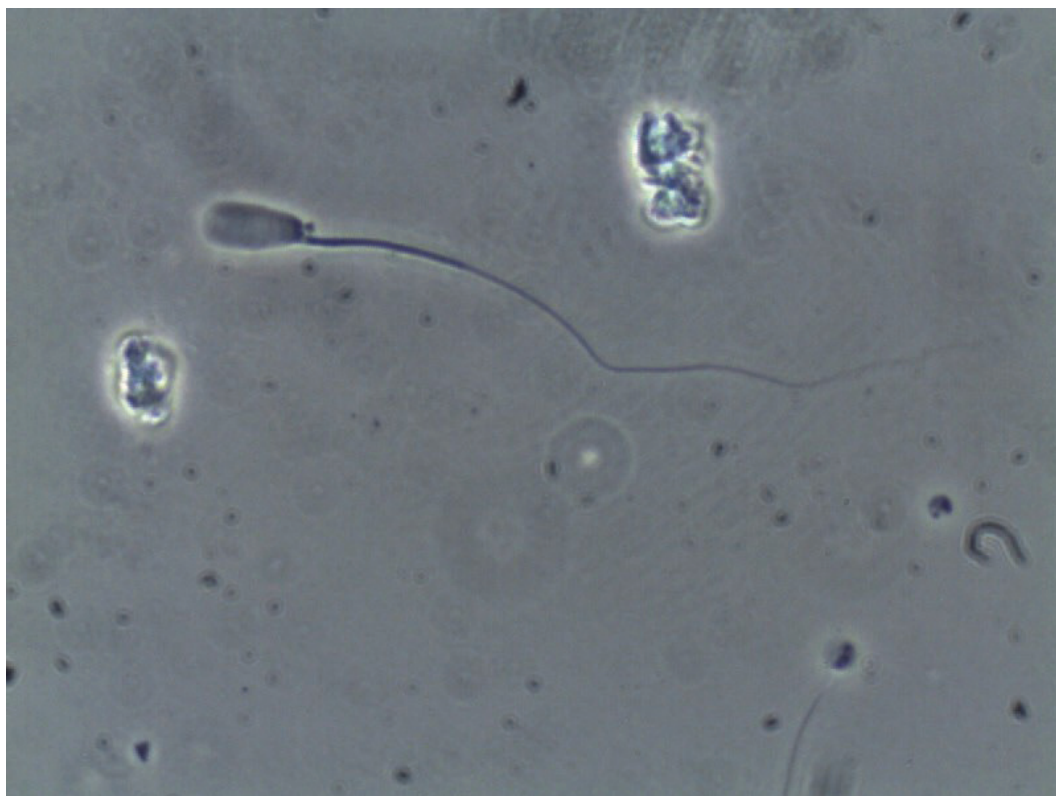


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 58.** Espermatozoide com inserção de cauda abaxial. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 59.** Espermatozoide com inserção retroaxial de peça intermediária e cauda fortemente enrolada (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

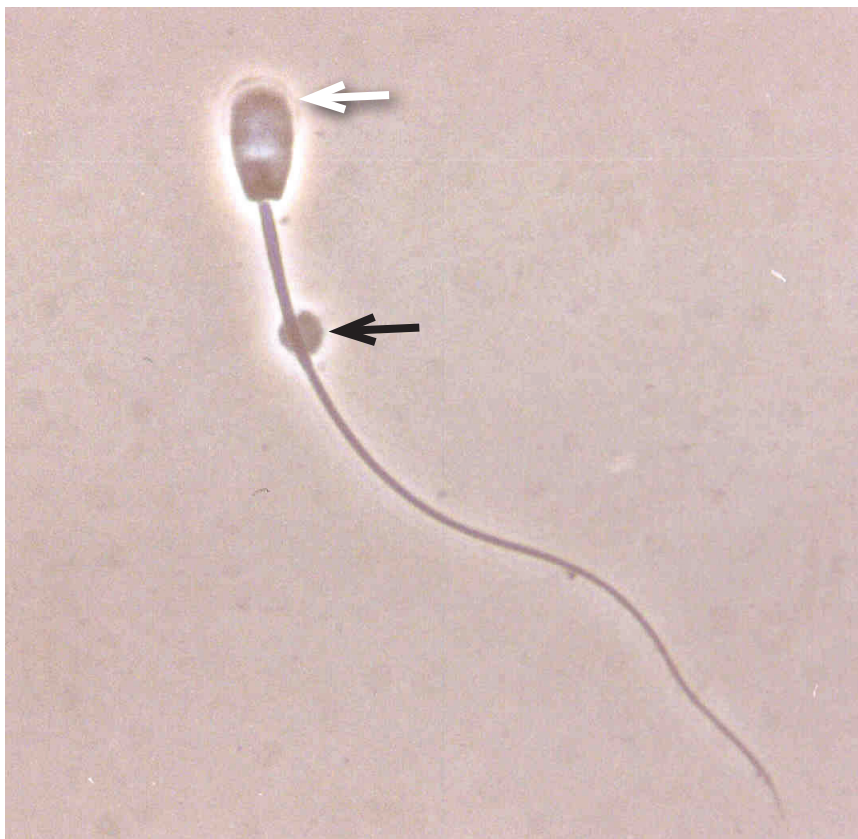


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 60.** Espermatozoide com gota citoplasmática distal (seta preta) na peça intermediária e acrossoma rugoso (seta branca). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 61.** Espermatozoide com inserção da cauda retroabaxial. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 62.** Espermatozoide com inserção da cauda retroaxial (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



## Defeitos de Cauda Espermática



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 63.** Espermatozoide com cauda dobrada. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

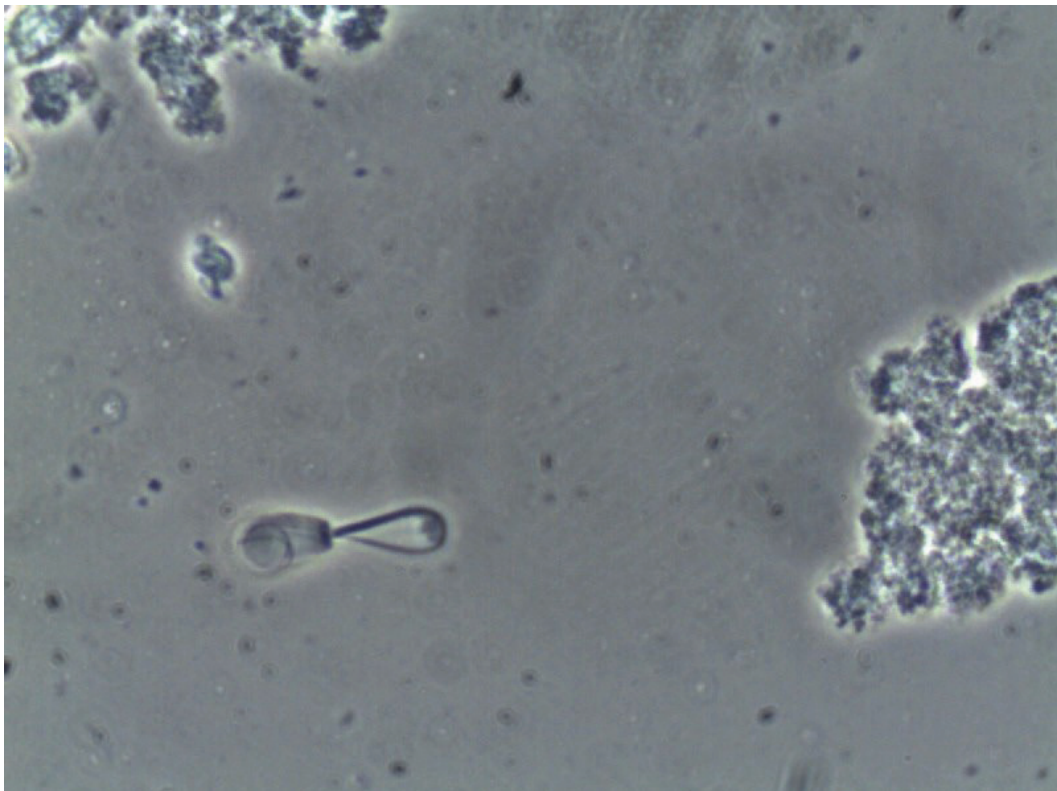


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 64.** Espermatozoide com cauda fortemente dobrada com gota citoplasmática. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 65.** Espermatozoide com cauda fortemente dobrada com gota citoplasmática. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

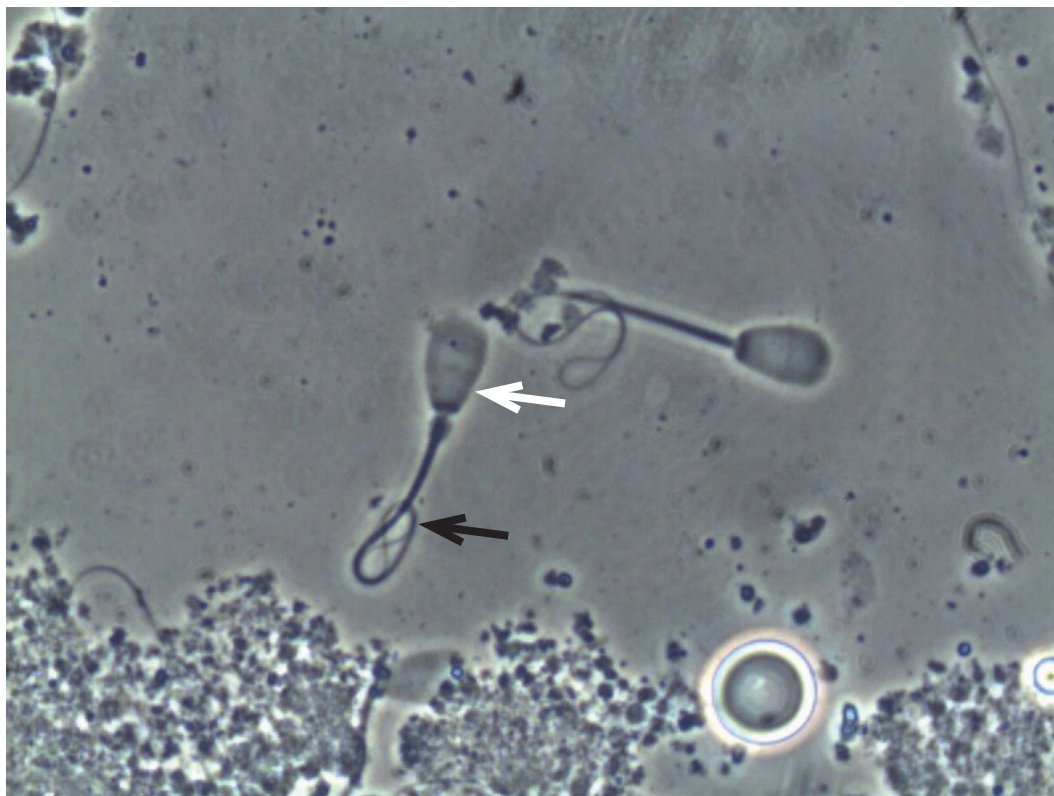


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 66.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada (seta preta) e gota citoplasmática proximal (seta branca). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

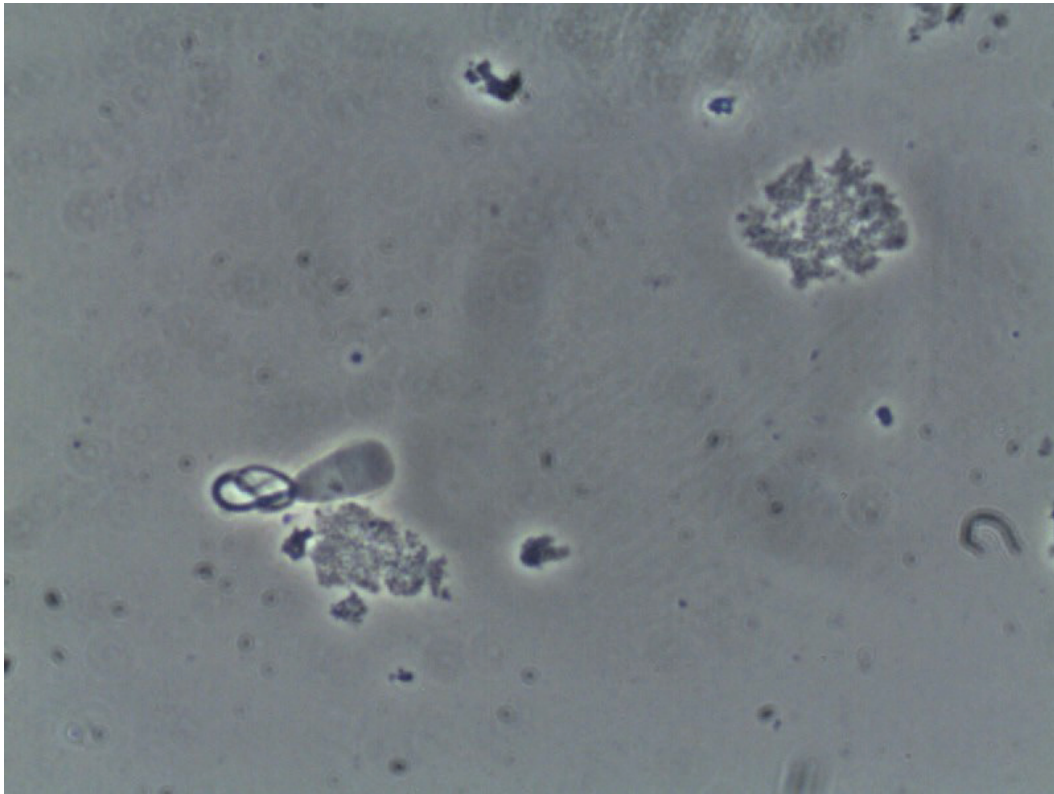


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 67.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

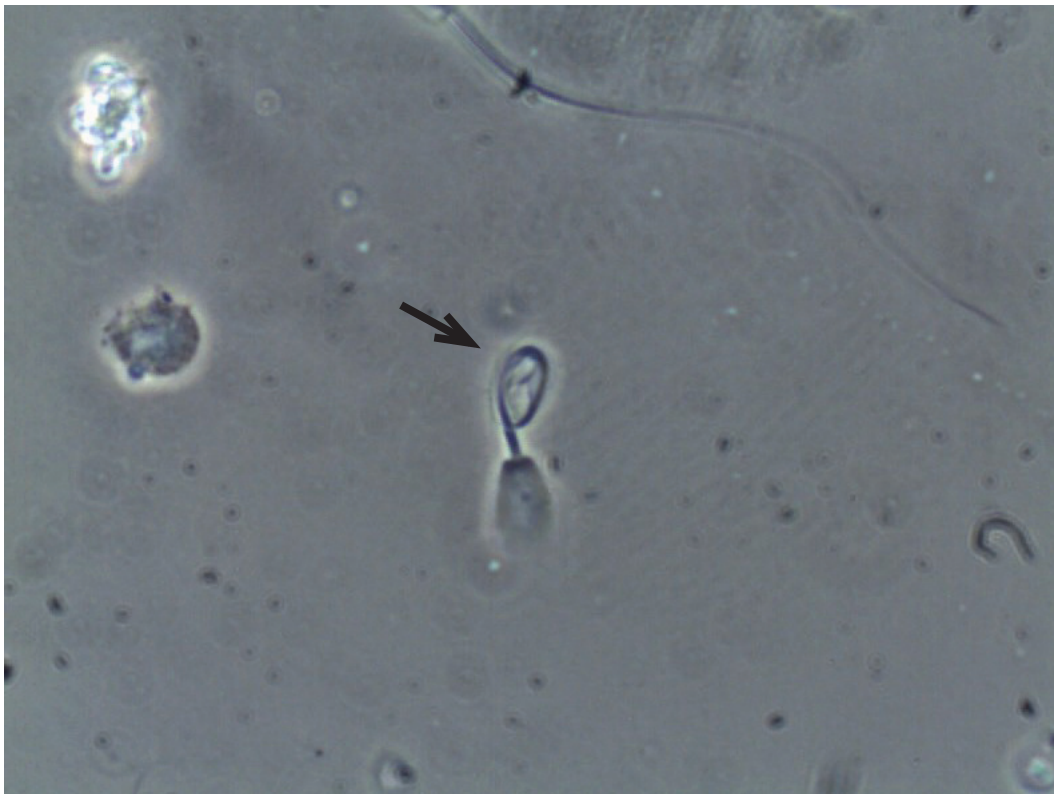


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 68.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada (seta). Microscopia de Contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

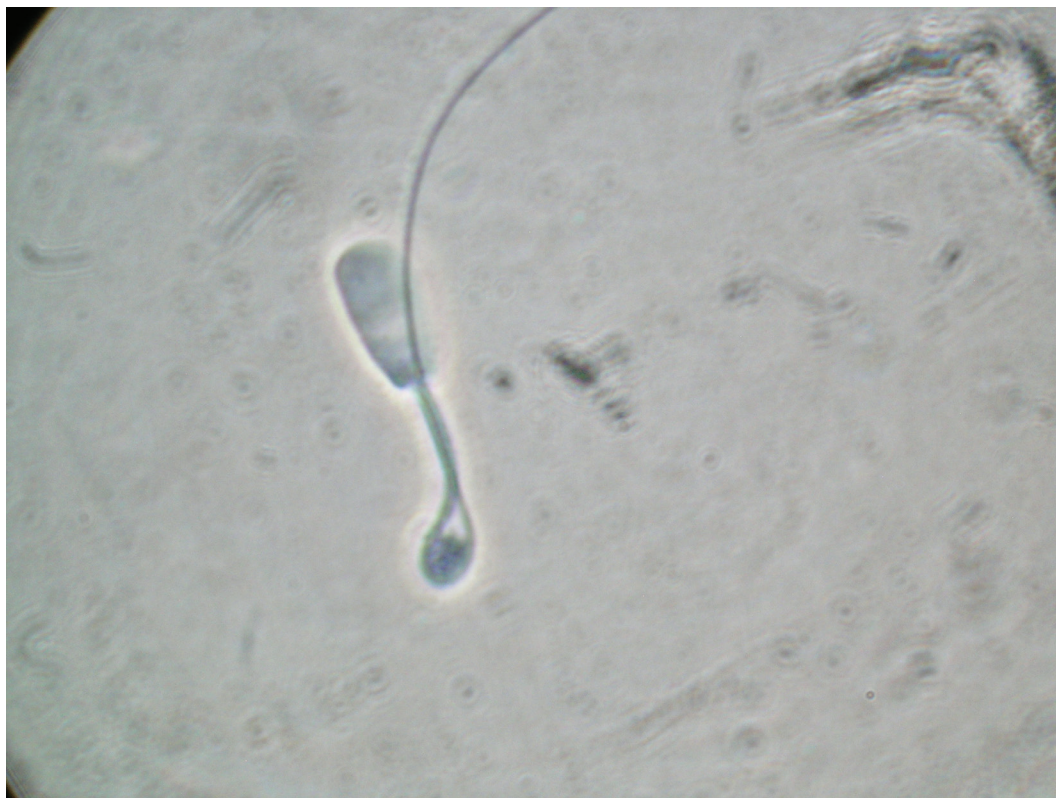


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 69.** Espermatozoide com com cauda fortemente dobrada com gota citoplasmática distal. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 70.** Espermatozoide com cauda enrolada. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 71.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

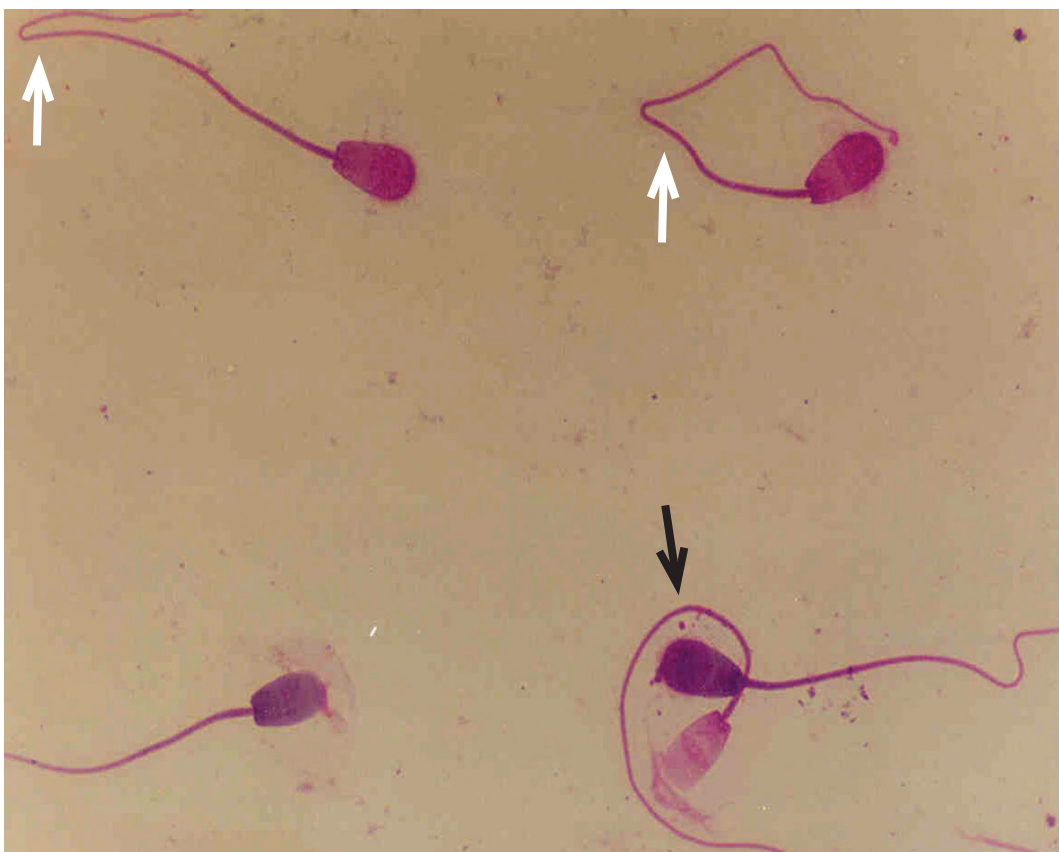


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 72.** Espermatozoides com cauda dobrada (setas brancas) e enrolada (seta preta). Coloração com Trypan Blue e Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 73.** Espermatozoide com cauda fortemente dobrada. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

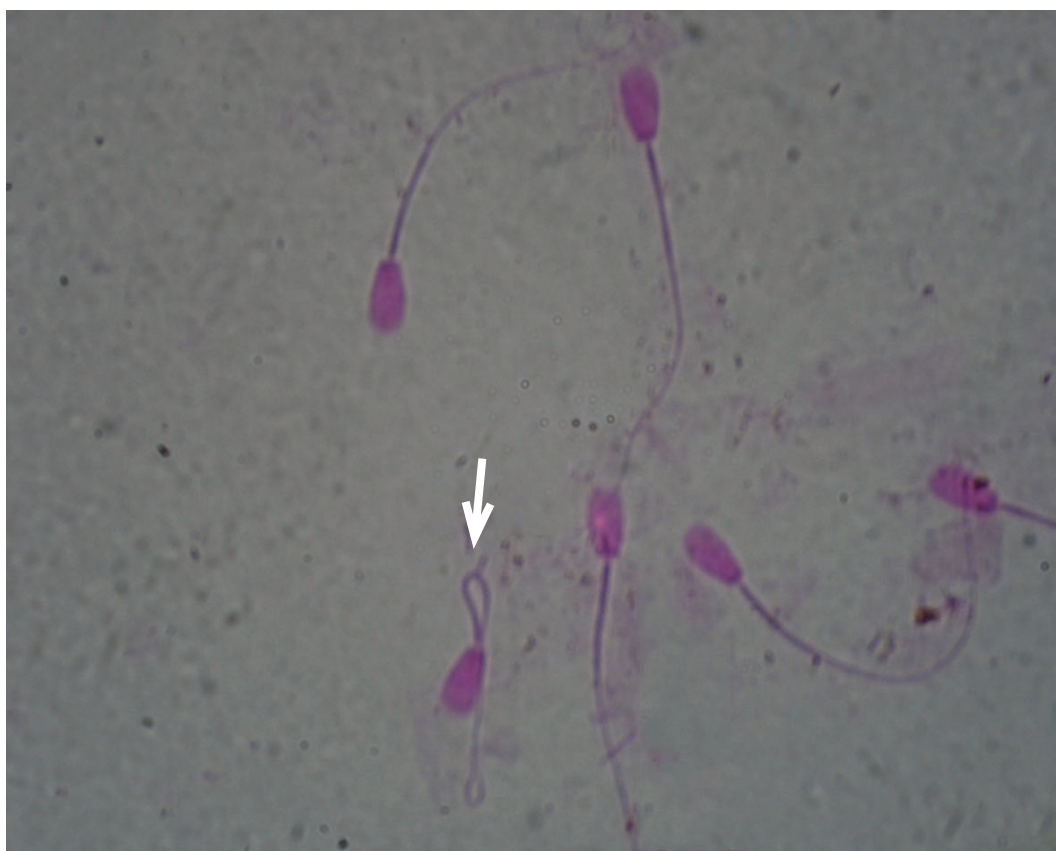


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 74.** Espermatozoide com cauda fortemente dobrada (seta). Coloração com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de duzentas vezes).



Foto: Carolina Gonzales da Silva

**Figura 75.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada. Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 76.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada e alteração em peça intermediária. Coloração com rosa bengala (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 77.** Espermatozoide com cauda fortemente enrolada. Coloração com Giemsa. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 78.** Espermatozoide com cauda fortemente dobrada com gota citoplasmática distal. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



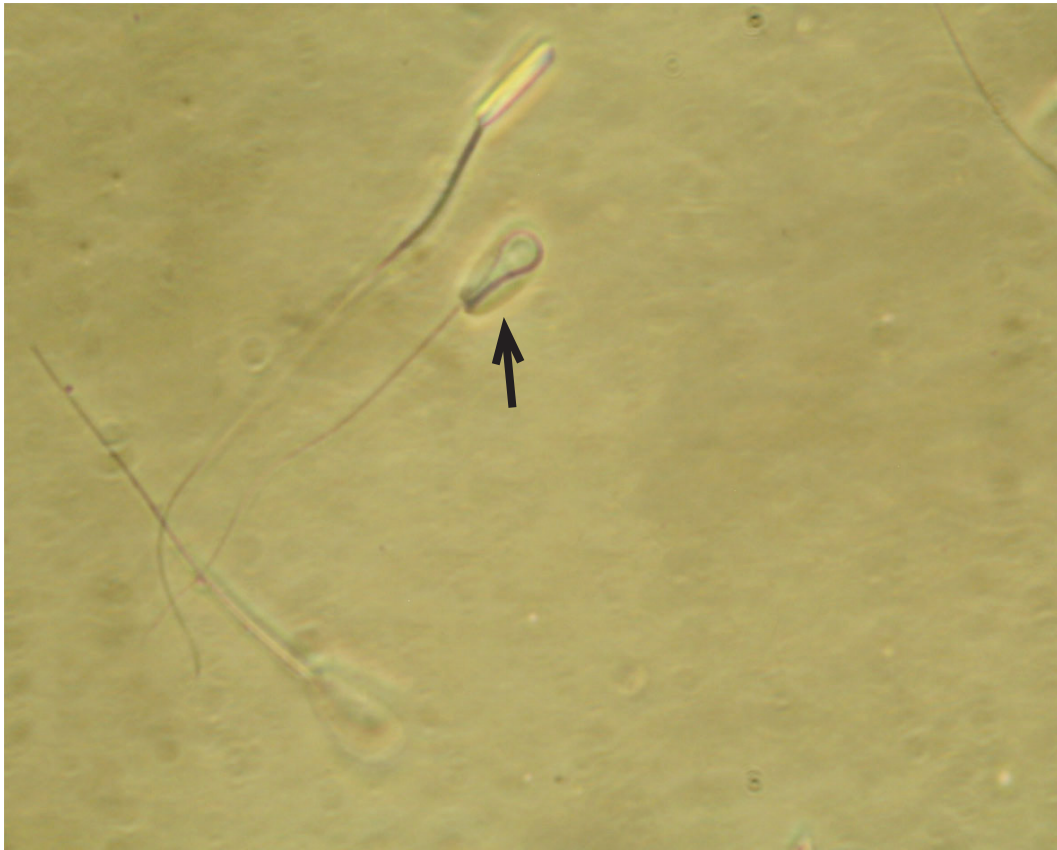


Foto: Antônio Emídio Feliciano Silva

**Figura 79.** Espermatozoide com cauda enrolada na cabeça (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

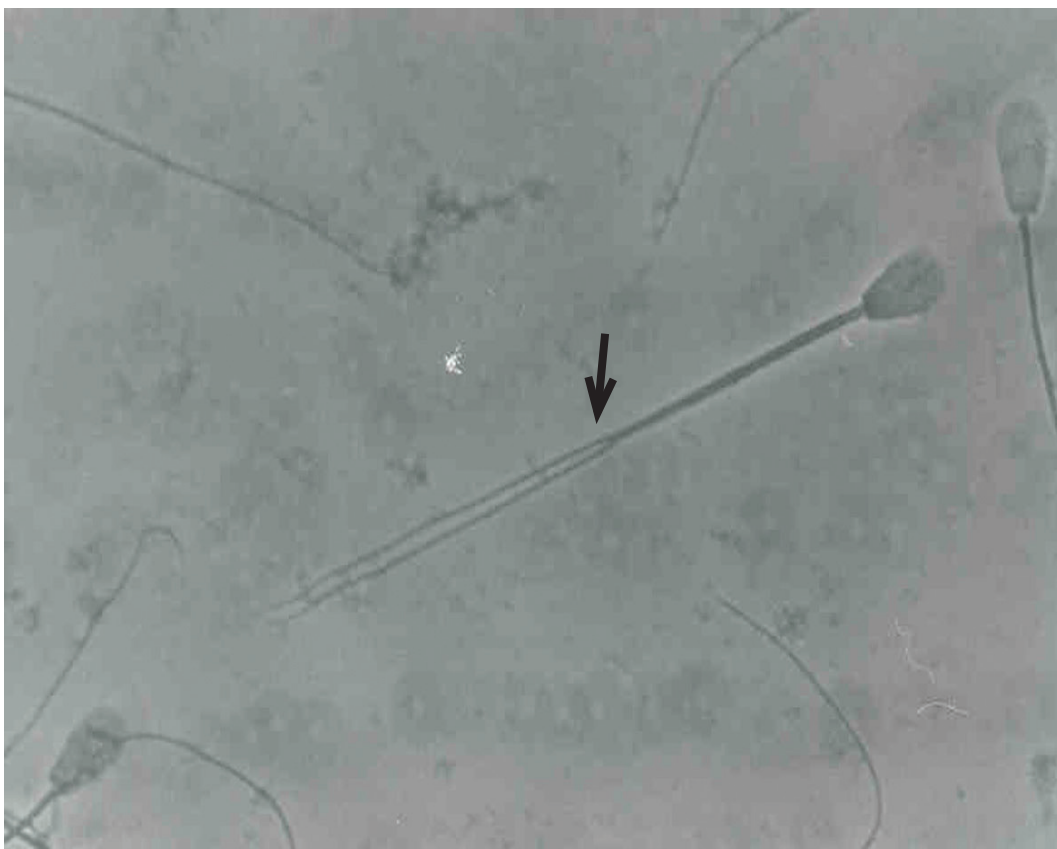


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 80.** Espermatozoide com cauda dupla associada à peça intermediária dupla (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 81.** Espermatozoide com cauda dupla fortemente enrolada. Coloração com rosa bengala. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

## Outros Elementos Seminais

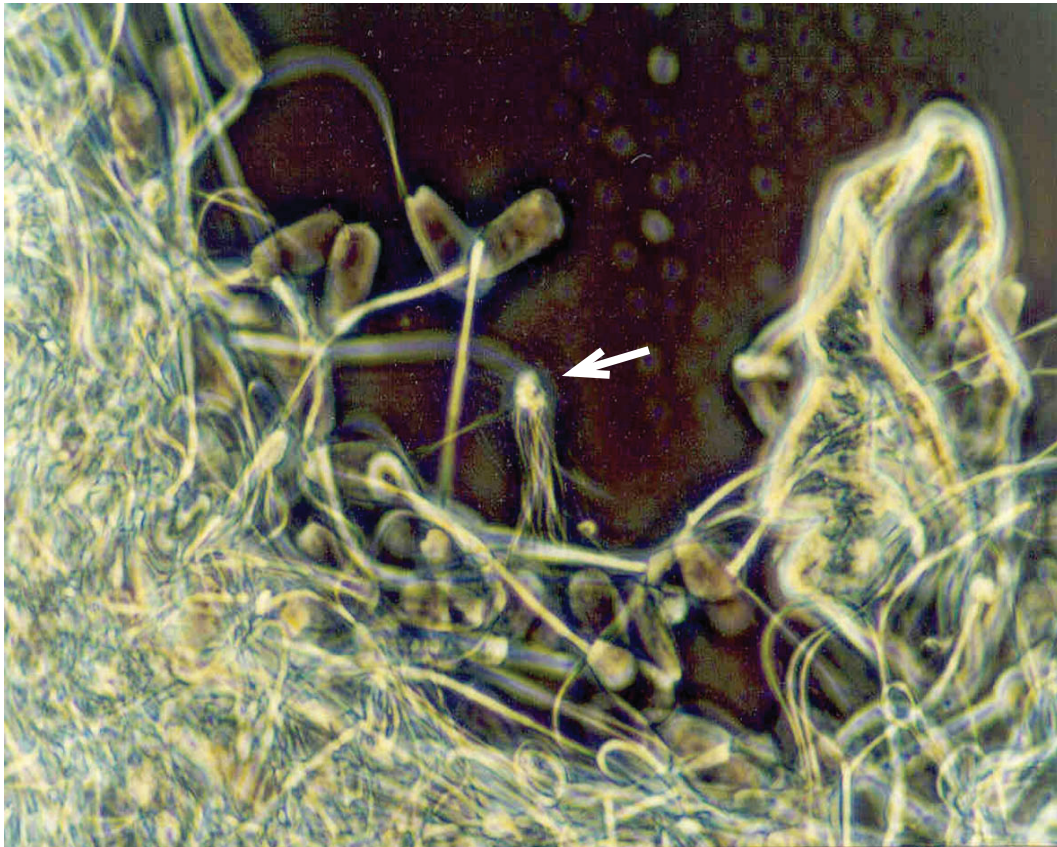


Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 82.** Forma teratológica medusa (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 83.** Célula de descamação (seta). Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

## Avaliações Espermáticas Complementares

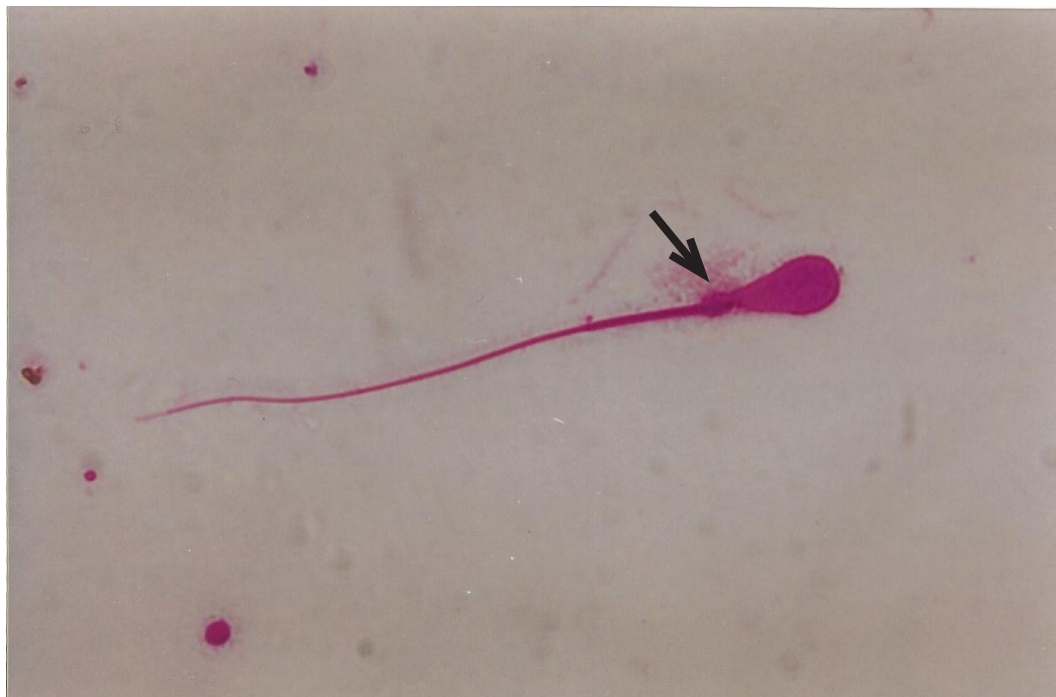


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 84.** Espermatozoide corado por rosa bengala para avaliação morfológica. Espermatozoide com gota citoplasmática proximal (aumento de mil vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 85.** Espermatozoides corados Giemsa apresentando ausência de acrossoma (seta branca), destacamento de acrossoma (seta preta) e cauda fortemente enrolada (seta azul) (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 86.** Espermatozoides corados por Giemsa para avaliação morfológica. Espermatozoide com cauda enrolada (seta) (aumento de mil vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 87.** Espermatozoide submetido ao teste hiposmótico para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide com cauda dobrada classificado como íntegro. Microscopia de contraste de fase (aumento de mil vezes).

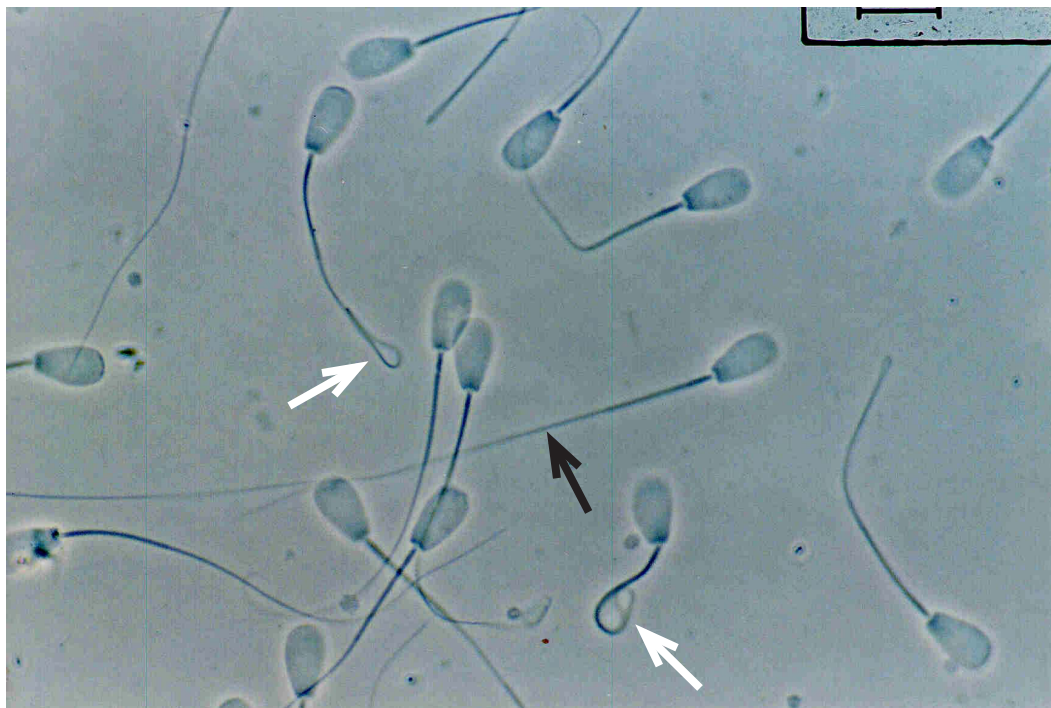


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 88.** Espermatozoides submetido ao teste hiposmótico para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoides com cauda dobrada (seta branca) classificados como íntegros e espermatozoides sem dobra de cauda (seta preta) classificados como lesados. Microscopia de contaste de fase (aumento de quatrocentas vezes).

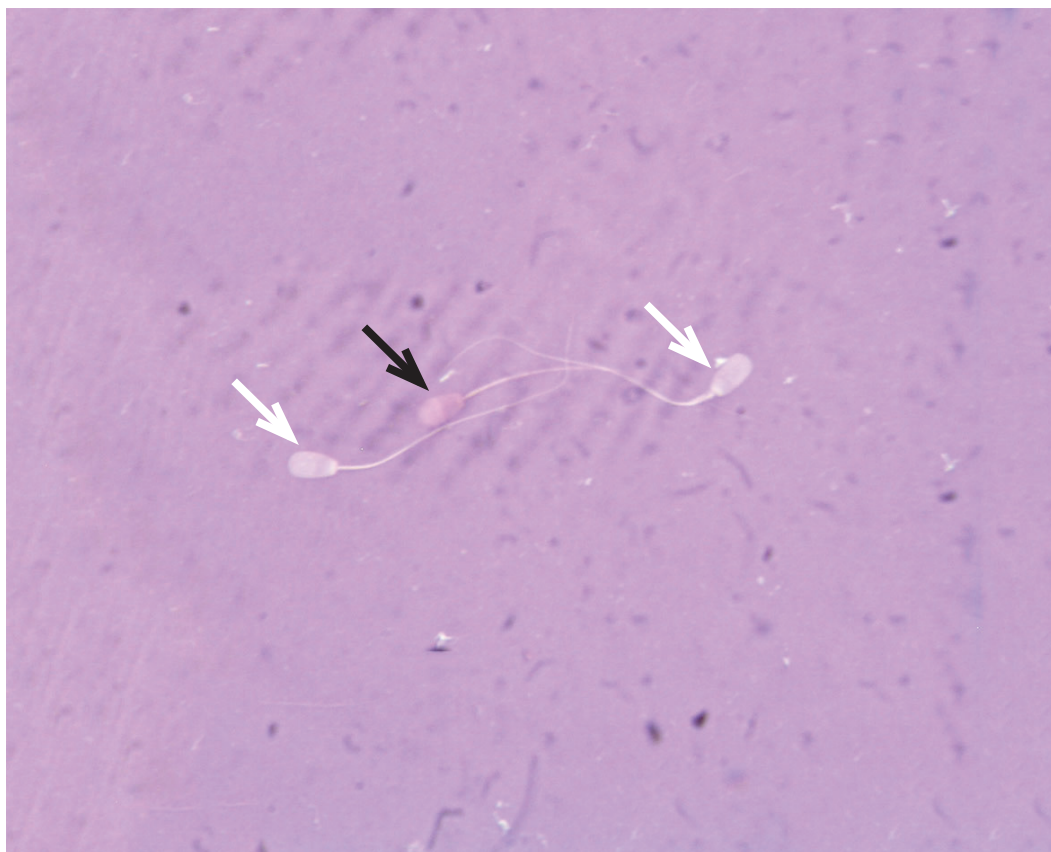


Foto: Carolina Gonzales da Silva

**Figura 89.** Espermatozoides corados com eosina e nigrosina para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoides não corados (seta branca) são classificados como íntegros e espermatozoides corados de rosa/roxo (seta preta) são classificados como lesados. Microscopia de campo claro (aumento de duzentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 90.** Espermatozoides corados com eosina nigrosina para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide não corado é classificado como íntegro (seta branca) e espermatozoide corado de rosa/roxo (seta preta) é classificado como lesado. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 91.** Espermatozoides corados com eosina nigrosina para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoides não corados (seta branca) são classificados como íntegro e espermatozoide corado de roxo (seta preta) é classificado como lesado. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

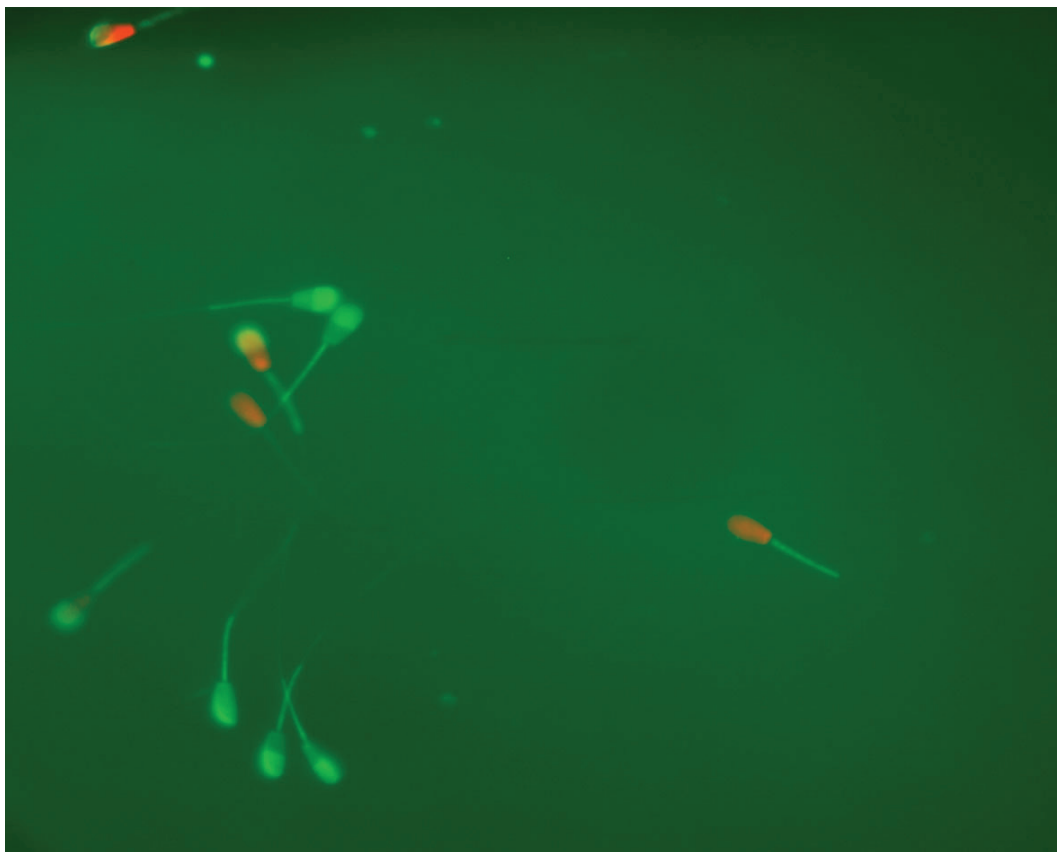


Foto: Carolina Gonzales da Silva

**Figura 92.** Espermatozoides corados com sonda fluorescente diacetato de 6 carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide corado de verde é classificado como íntegro e espermatozoide corado de vermelho é classificado como lesado. Microscopia de epifluorescência (aumento de cem vezes).

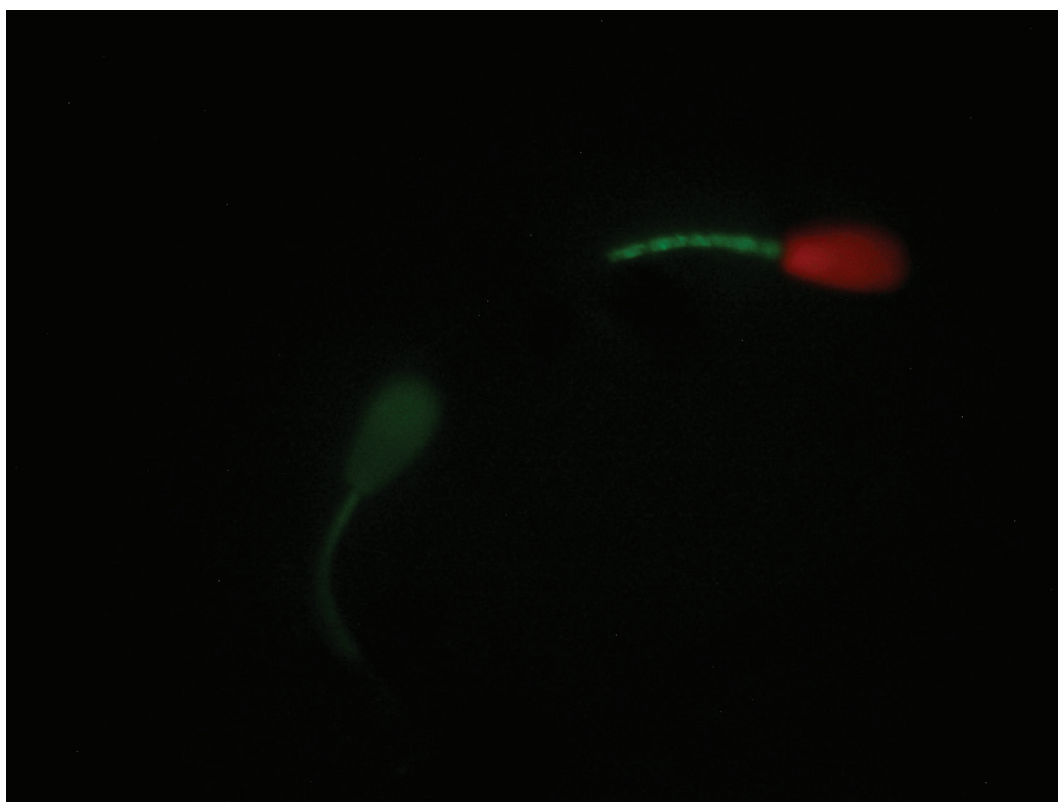


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 93.** Espermatozoides corados com sonda fluorescente diacetato de 6 carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide corado de verde é classificado como íntegro, e corado de vermelho é classificado como lesado. Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).





Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 94.** Espermatozoide corado pela conjugação da sonda fluorescente isoticianato de flouoresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut aglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma. Espermatozoide vivo com acrossoma reagido (A) apresenta-se corado apenas na região acrossomal. Espermatozoide morto com acrossoma reagido (B) apresenta-se corado com FITC-PNA e IP. Espermatozoide morto com acrossoma íntegro (C) apresenta-se corado apenas com IP. Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

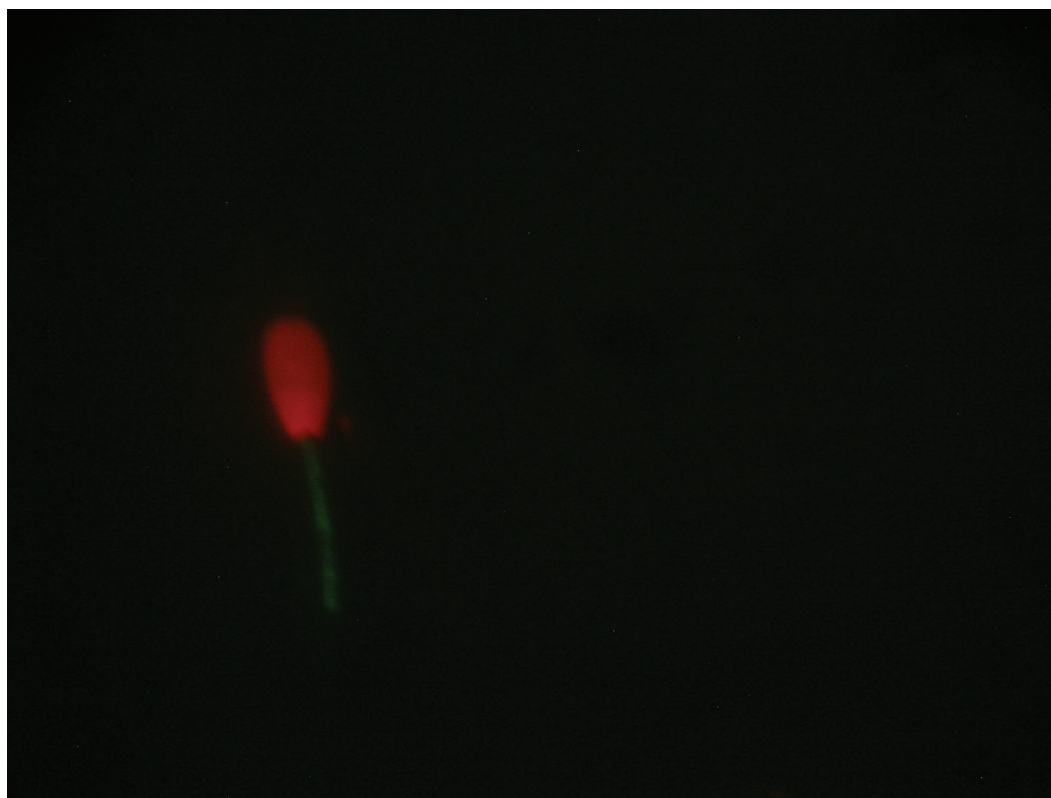


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 95.** Espermatozoide corado com corante fluorescente diacetato de 6 carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide corado de vermelho é classificado como lesado. Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

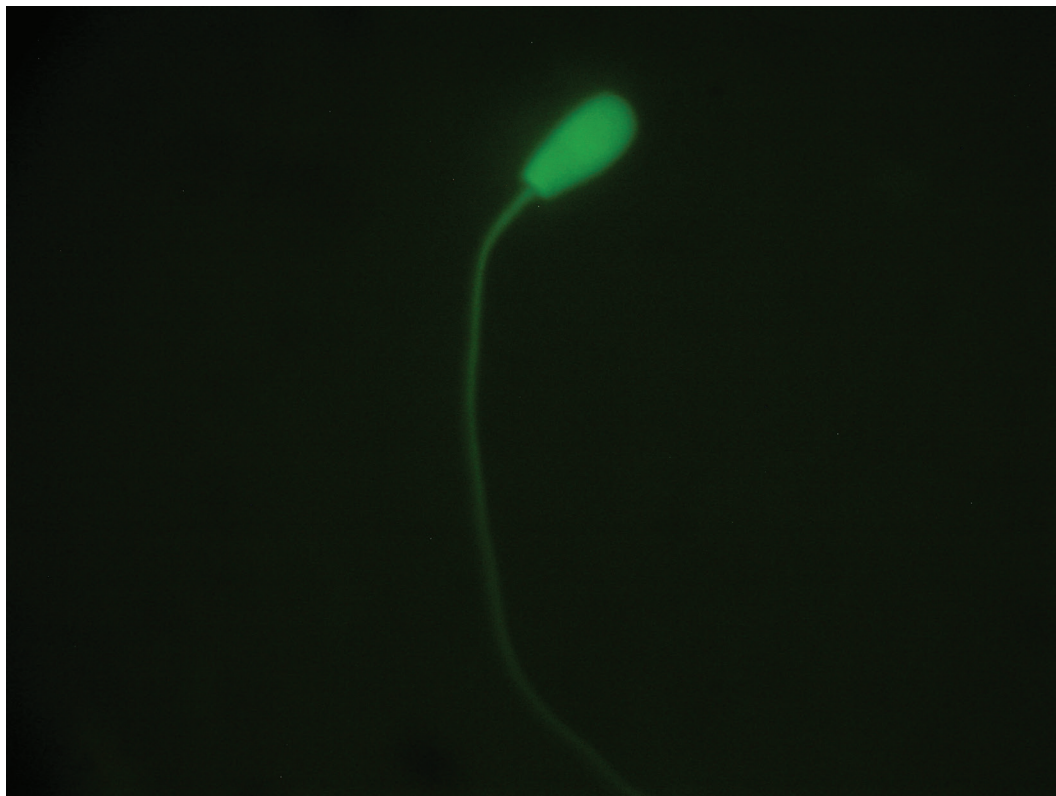


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 96.** Espermatozoide corado com sonda fluorescente diacetato de 6 carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide corado de verde é classificado como íntegro. Microscopia de epifluorescência. (aumento de mil vezes).

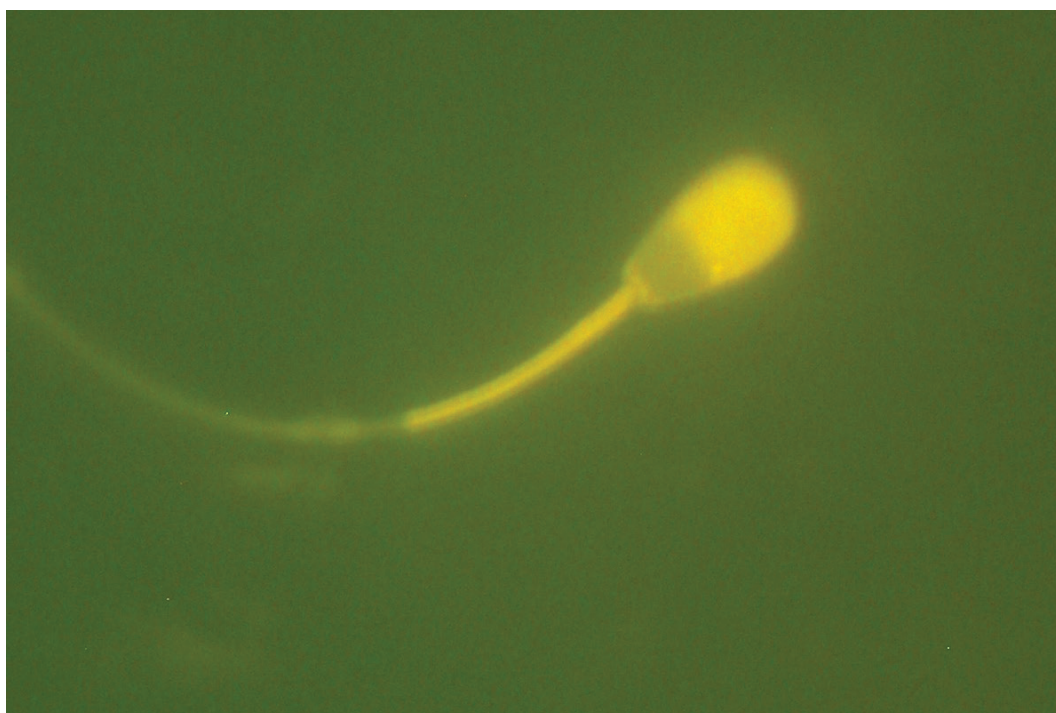


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 97.** Espermatozoide corado com hidróclorido de clortetraciclina (CTC) apresentando baixa fluorescência na região pós-acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (padrão capacitado). Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

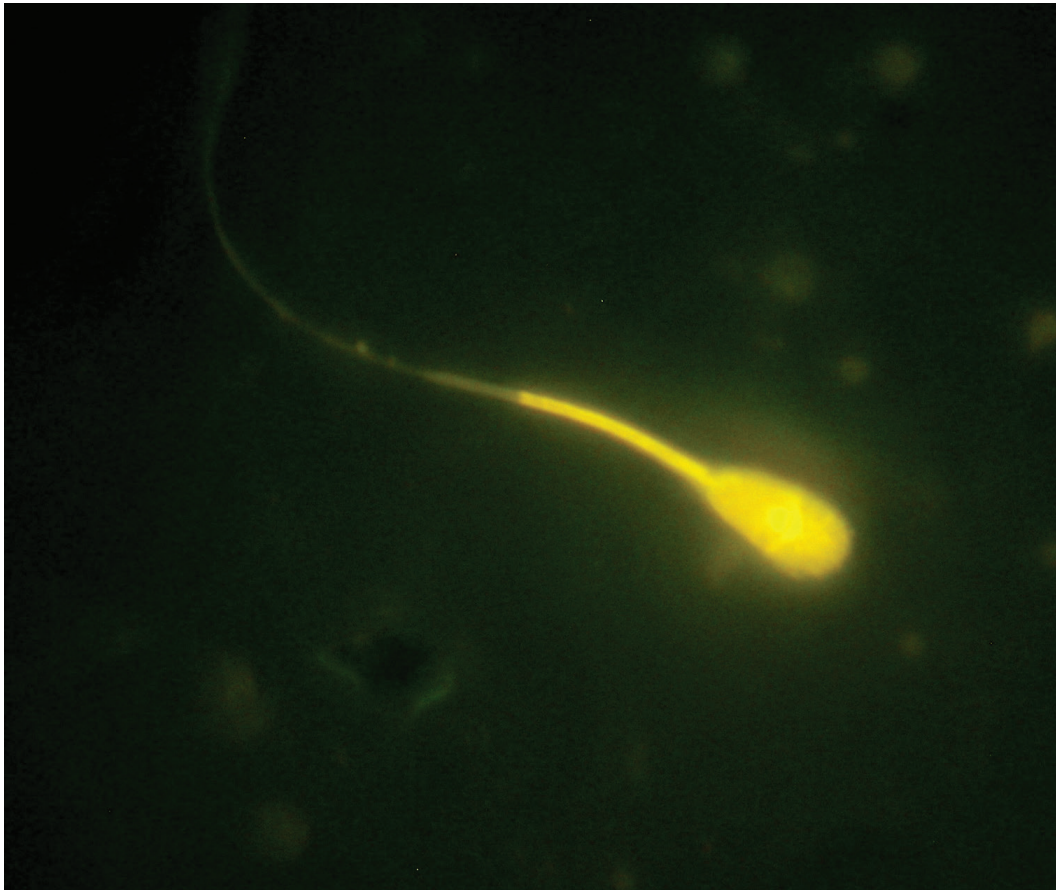


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 98.** Espermatozoide corado com hidróclorido de clortetraciclina (CTC) apresentando fluorescência em toda a cabeça (padrão não capacitado). Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

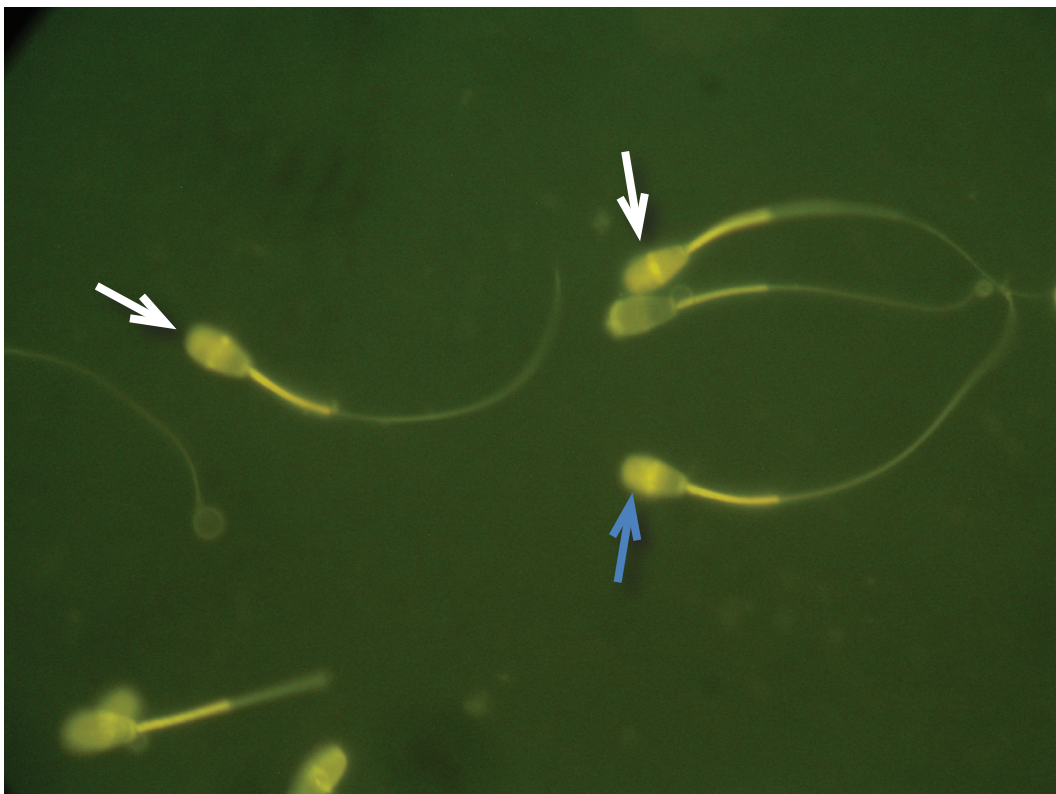


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 99.** Espermatozoides corados com hidróclorido de clortetraciclina (CTC) apresentando baixa fluorescência na região acrossomal (padrão capacitado; seta azul) ou baixa fluorescência na cabeça, com um anel brilhante na região equatorial (padrão reagido; seta branca). Microscopia de epifluorescência (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 100.** Espermatozoide corado com hidróclorido de clortetraciclina (CTC) apresentando baixa fluorescência com um anel brilhante na região equatorial (padrão reagido). Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

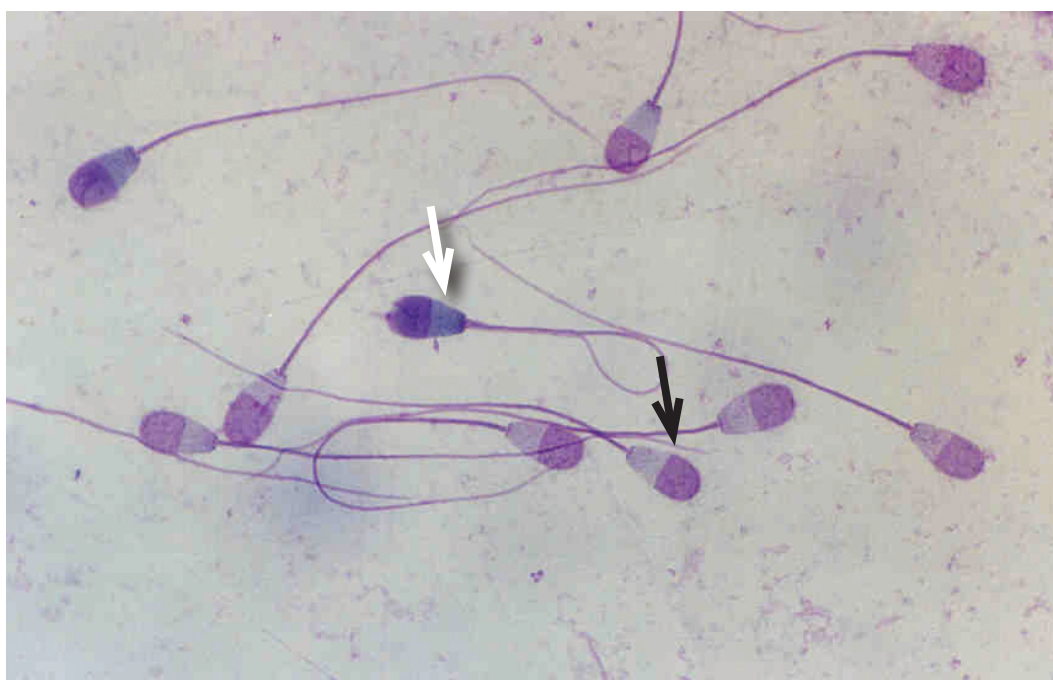


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 101.** Espermatozoides corados com Trypan Blue e Giemsa para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossoma. Espermatozoides com cabeça azul (seta branca) são classificados como lesados e com cabeça rosa (seta preta) como íntegros. Acrossomas corados são classificados como não reagidos. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 102.** Espermatozoide corado com Trypan Blue e Giemsa para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossoma. Espermatozoide com cabeça azul, classificado como lesado e acrossoma corado, classificado como não reagido. Microscopia de campo claro (aumento de quatrocentas vezes).

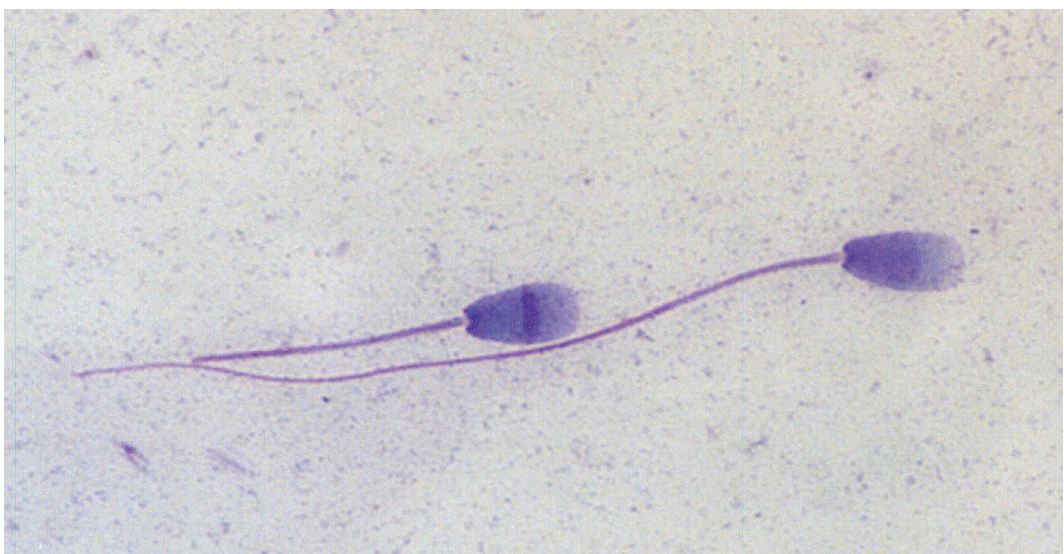


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 103.** Espermatozoides corados com Trypan Blue e Giemsa para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossoma. Espermatozoides com cabeça azul, classificados como lesados e acrossoma descorado, classificado como reagido. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

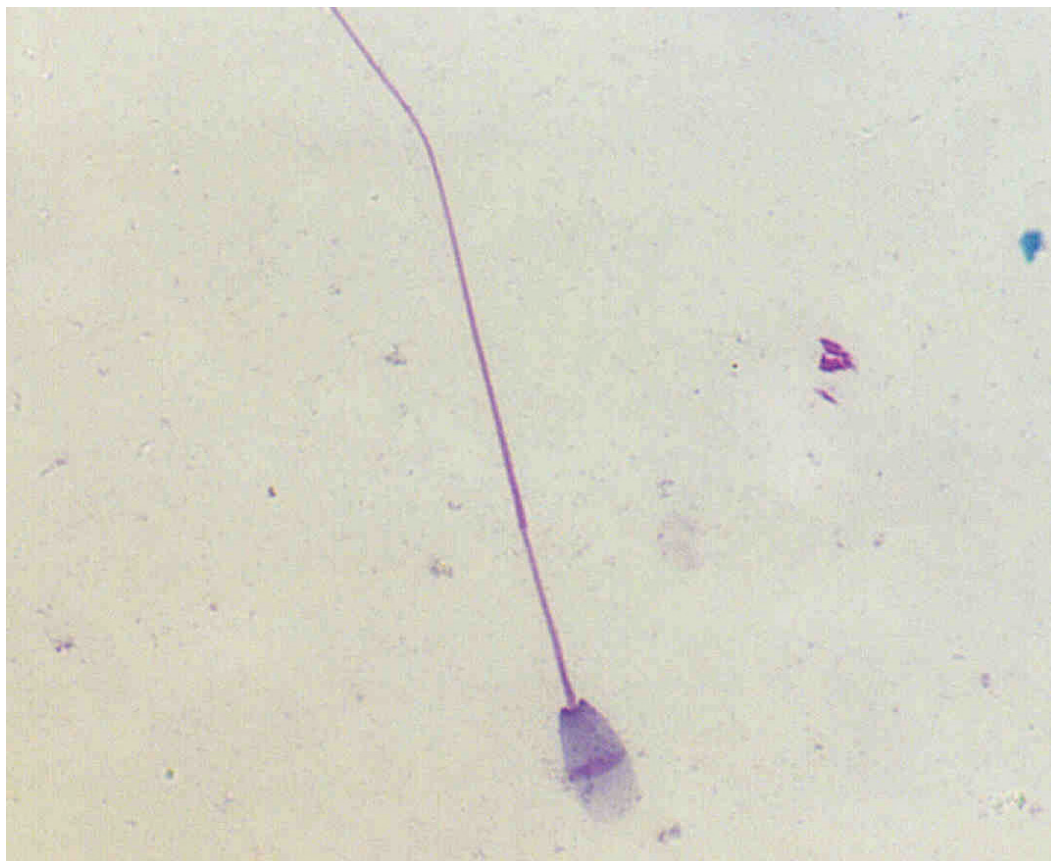


Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 104.** Espermatozoide corado com Trypan Blue e Giemsa para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossoma. Espermatozoide com região pós-acrossomal azul, classificado como lesado e acrossoma descorado, classificado como reagido. Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).

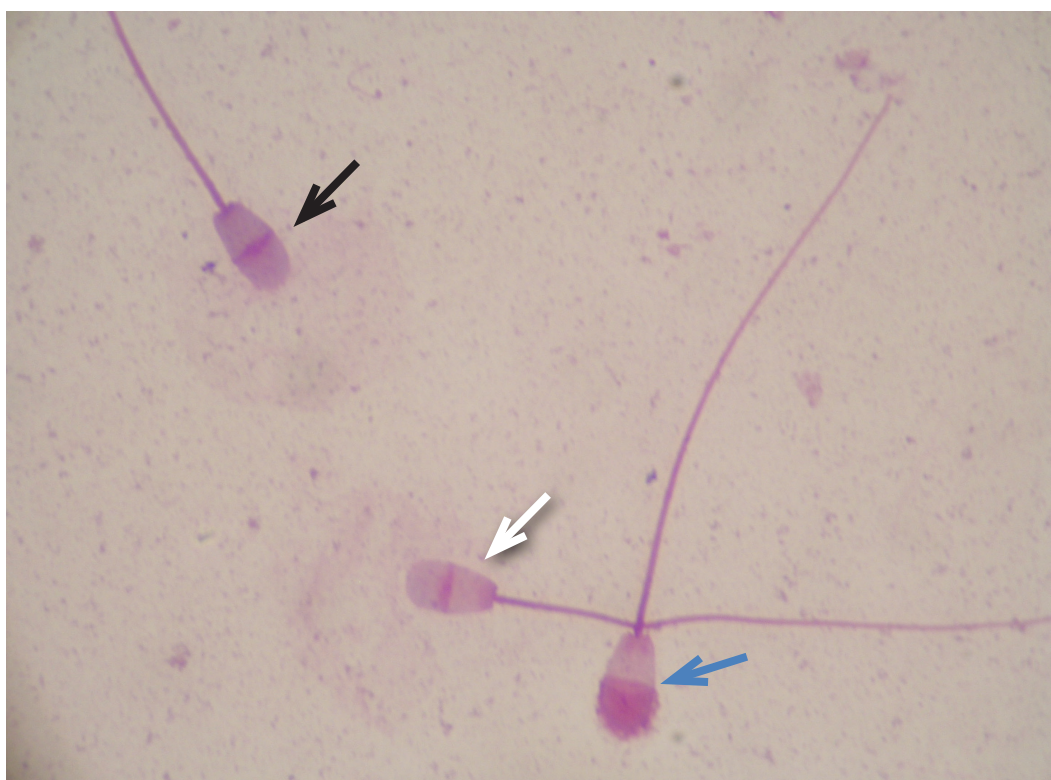


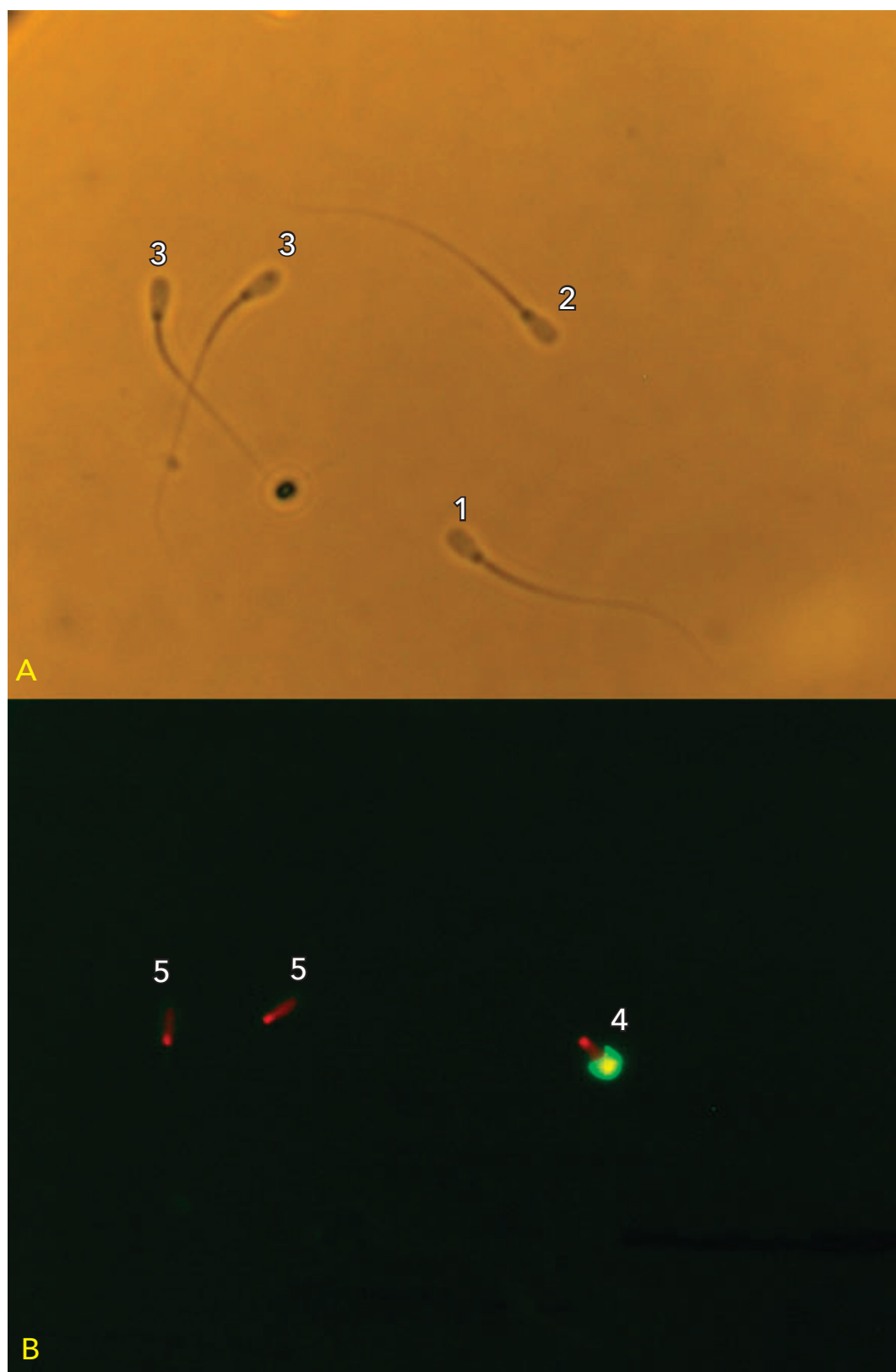
Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 105.** Espermatozoides corados com Trypan Blue e Giemsa para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossoma. Espermatozoides com cabeça azul e acrossoma descorado classificado como lesado e acrossoma reagido (seta preta); espermatozoide corado em rosa e acrossoma descorado classificado como íntegro e acrossoma reagido (seta branca); espermatozoide corado em rosa e acrossoma corado classificado como íntegro e acrossoma íntegro (seta azul). Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Foto: Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

**Figura 106.** Espermatozoides corados com Trypan Blue e Giemsa para avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossoma. Espermatozoides com a região pós-acrossomal azul são classificados como lesados e com região pós-acrossomal transparente são considerados íntegros. Acrossomas corados de rosa são classificados como não reagidos (intactos) e acrossomas descorados como reagidos (lesados). Microscopia de campo claro (aumento de mil vezes).



Fotos: Carolina Gonzales da Silva

**Figura 107.** Espermatozoides corados pela conjugação da sonda fluorescente isoticianato de fluotresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut aglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (1) visualizado no contraste de fase (A) não se apresenta corado com a conjugação de FITC-PNA e IP quando avaliado em epifluorescência (B). Espermatozoide morto com acrossoma reagido (2) visualizado no contraste de fase (A) apresenta-se corado com FITC-PNA e IP (4) quando observado em microscópio de epifluorescência (B). Espermatozoide morto com acrossoma íntegro (3) visualizado no contraste de fase (A), apresenta-se corado apenas com IP (5) quando observado em microscopia de epifluorescência (B).



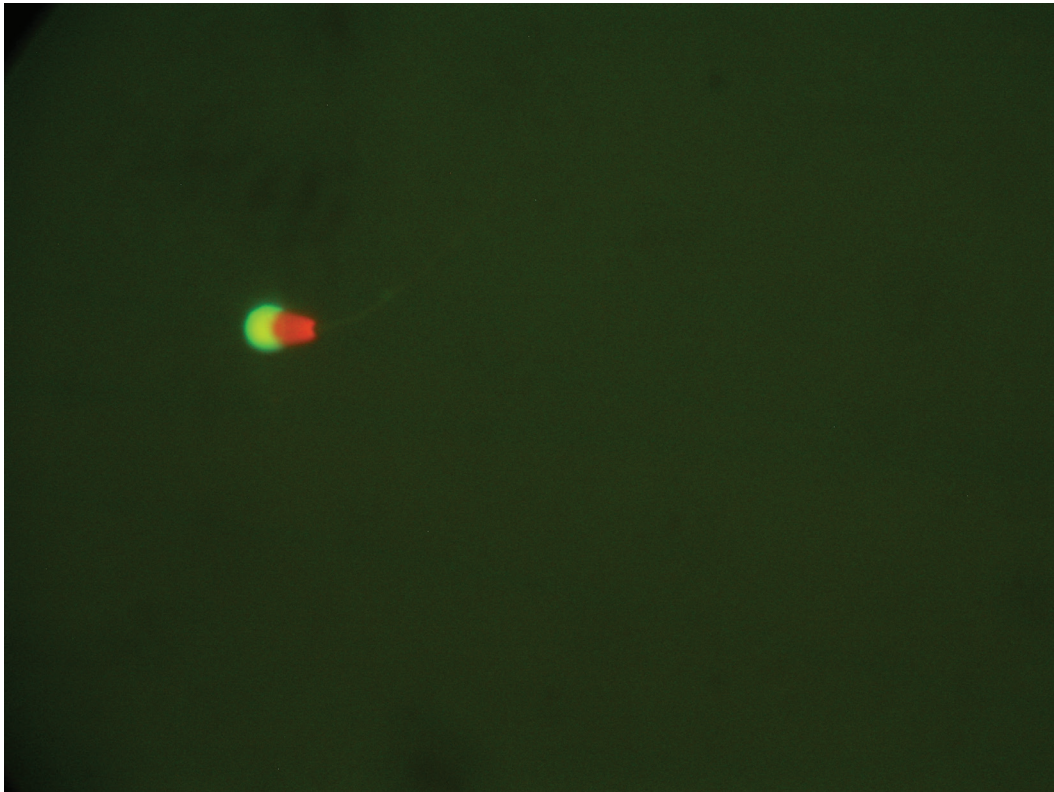


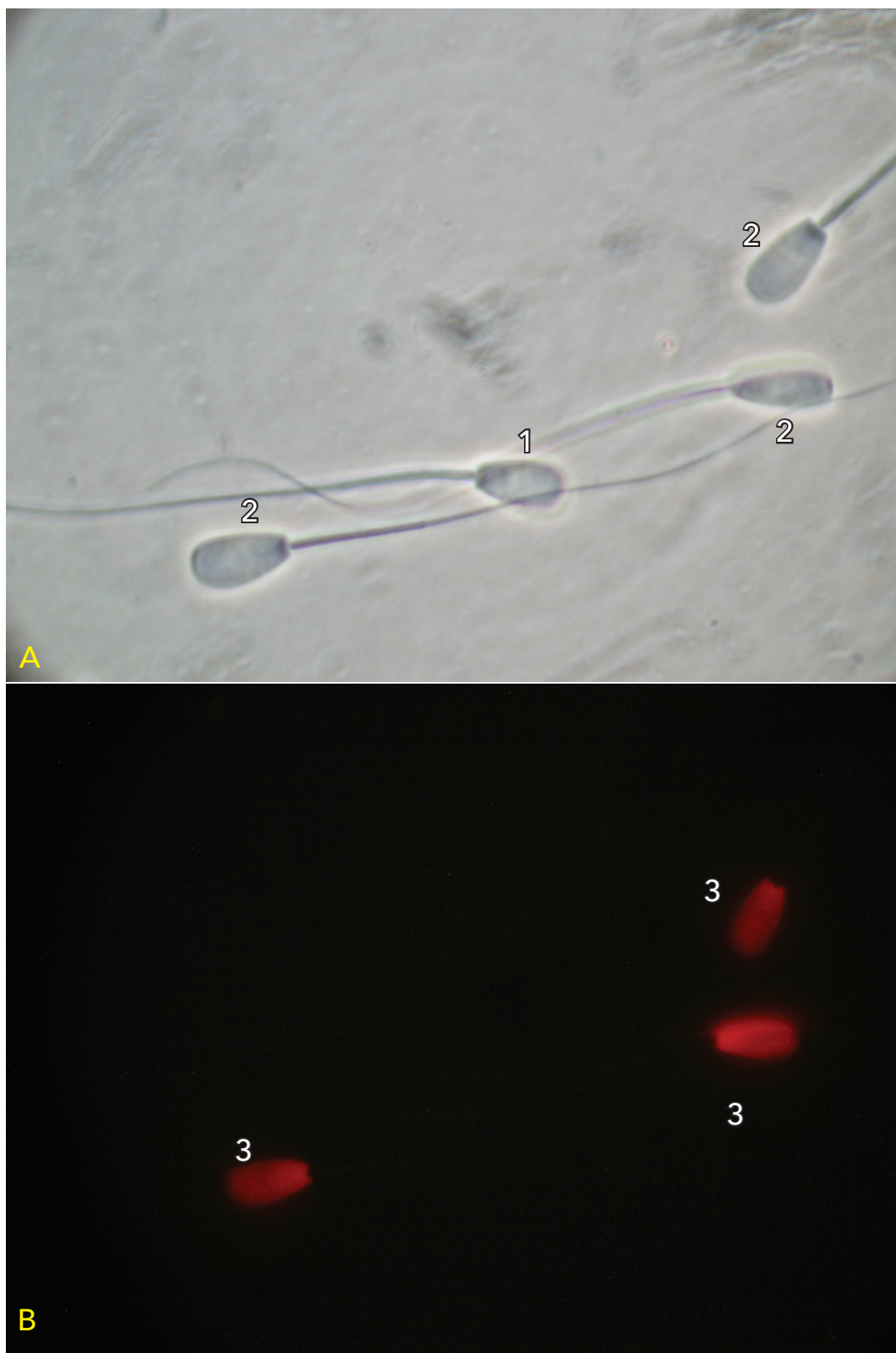
Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 108.** Espermatozoide corado pela conjugação da sonda fluorescente isoticianato de fluotresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut aglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma. Espermatozoide morto com acrossoma reagido apresenta-se corado com FITC-PNA e IP. Microscopia de epifluorescência (aumento de quatrocentas vezes).



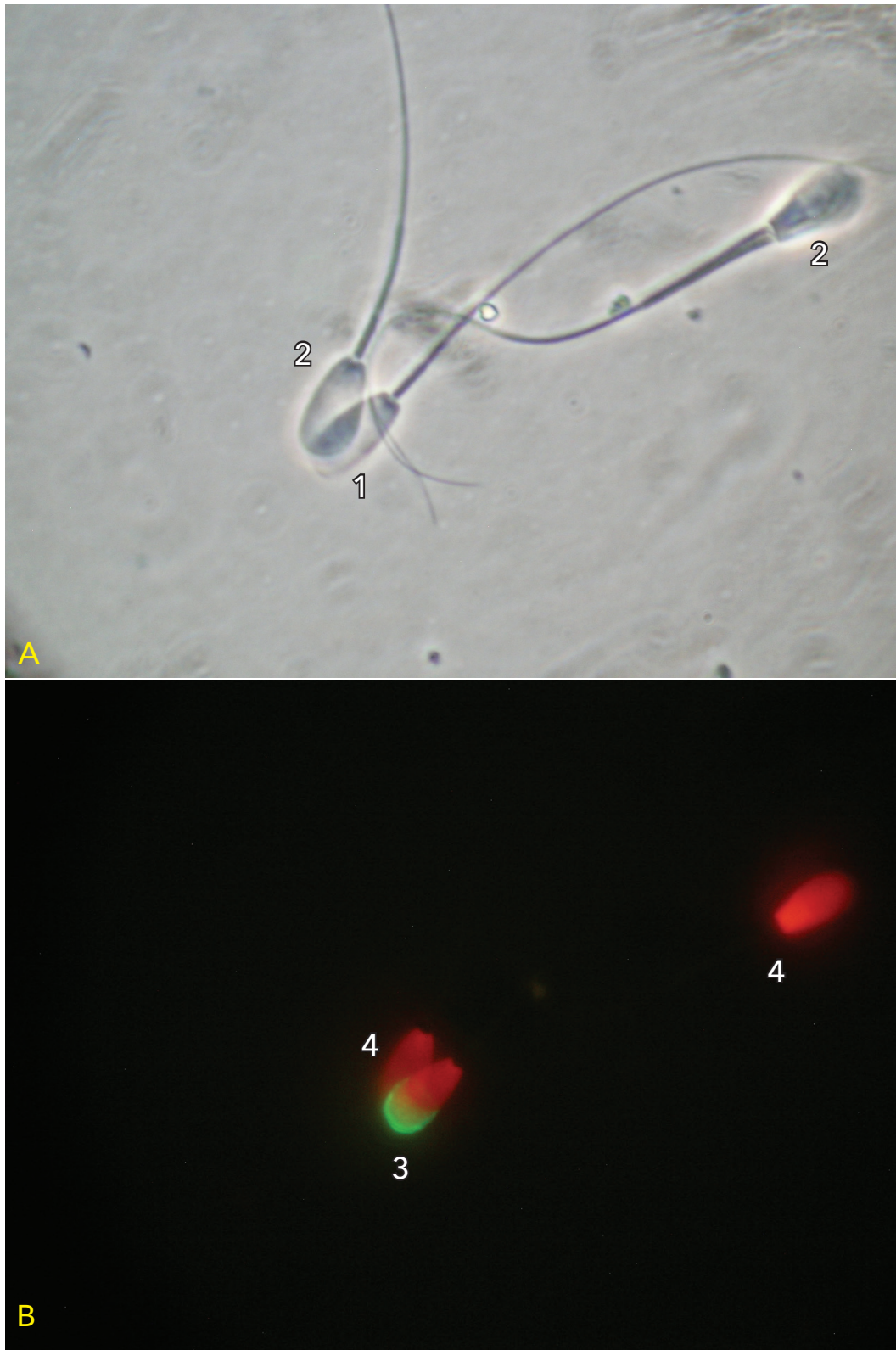
Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 109.** Espermatozoide corado pela conjugação da sonda fluorescente isoticianato de fluotresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut aglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma (aumento de quatrocentas vezes).



Fotos: José Oliveira Carvalho

**Figura 110.** Espermatozoide corado pela conjugação da sonda fluorescente isoticianato de fluotresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut agglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma. Espermatozoide morto com acrossoma reagido apresenta-se corado com FITC-PNA e IP. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (1) visualizado no contraste de fase (A) não se apresenta corado com a conjugação de FITC-PNA e IP quando avaliado em epifluorescência (B). Espermatozoide morto com acrossoma íntegro (2) visualizado no contraste de fase (A) apresenta-se corado apenas com IP (3) quando observado em microscopia de epifluorescência (B). Microscopia de contraste de fase (A) e epifluorescência (B) do mesmo campo de leitura (aumento de quatrocentas vezes).



Fotos: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 111.** Espermatozoides corados pela conjugação da sonda fluorescente isoticianato de fluotresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut agglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma. Espermatozoide morto com acrossoma reagido (1) visualizado no contraste de fase (A) apresenta-se corado com FITC-PNA e IP (3) quando observado em microscópio de epifluorescência (B). Espermatozoide morto com acrossoma íntegro (2) visualizado no contraste de fase (A) apresenta-se corado apenas com IP (4) quando observado em microscopia de epifluorescência (B). Microscopia de contraste de fase (A) e epifluorescência (B) do mesmo campo de leitura (aumento de quatrocentas vezes).



Foto: José Oliveira Carvalho

**Figura 112.** Espermatozoides corados pela conjugação da sonda fluorescente isotiocianato de fluotresceína - FITC com lecitina de amendoim (Peanut aglutinin - PNA), e iodeto de propídeo (IP) para avaliação da integridade de acrossoma. Espermatozoides vivos com acrossoma reagido observados em microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

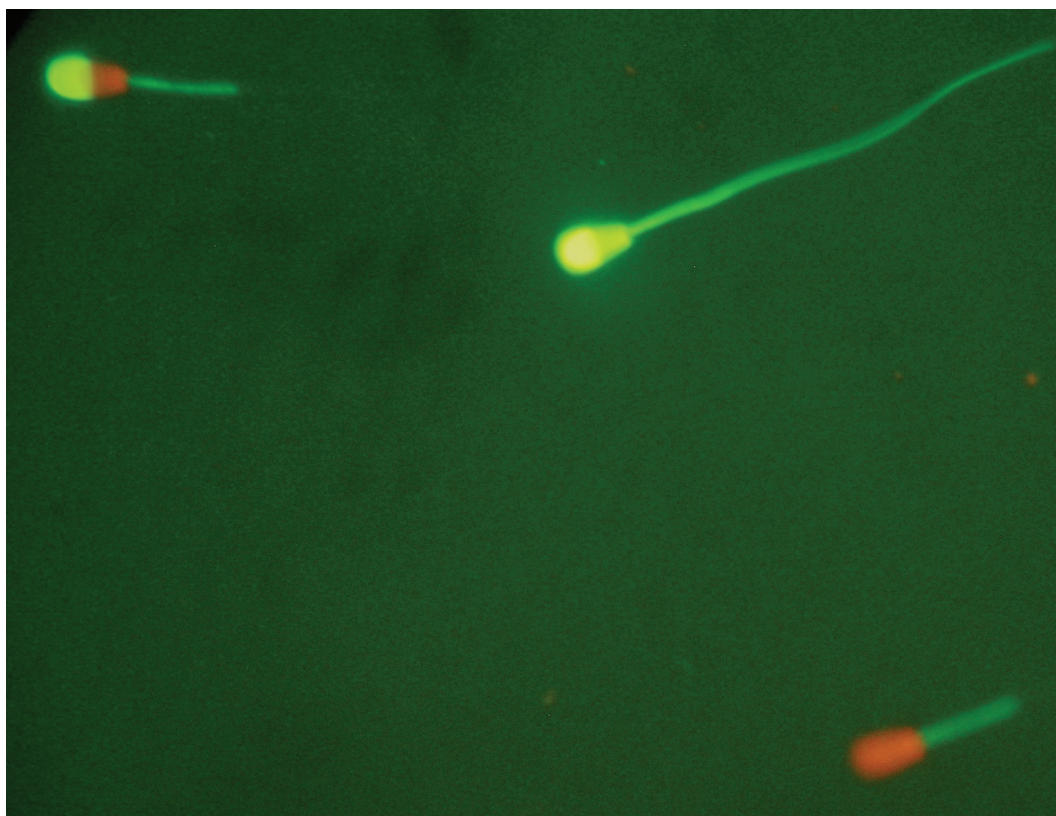


Foto: Margot Alves Nunes Dode

**Figura 113.** Espermatozoides corados com sonda fluorescente diacetato de 6 carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) para avaliação de integridade de membrana plasmática. Espermatozoide corado de verde é classificado como íntegro, corado de vermelho é classificado como lesado e corado de verde na região acrossomal e vermelho na base é classificado como semi lesado. Microscopia de epifluorescência (aumento de mil vezes).

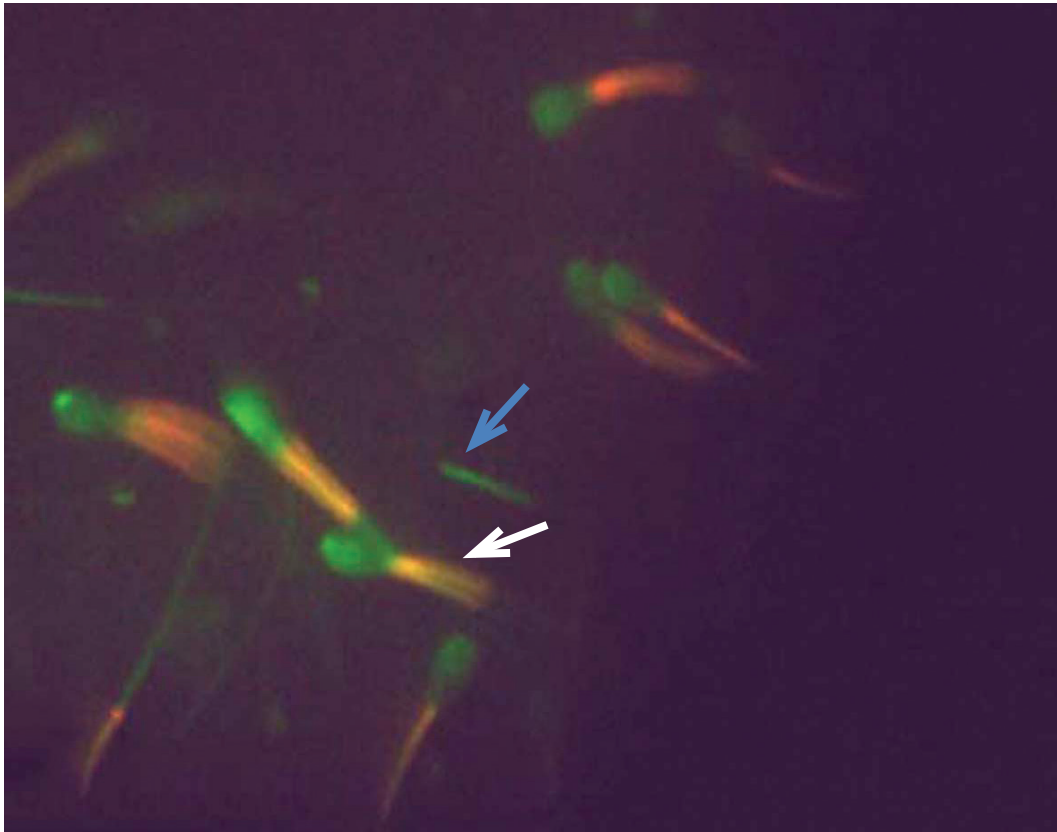
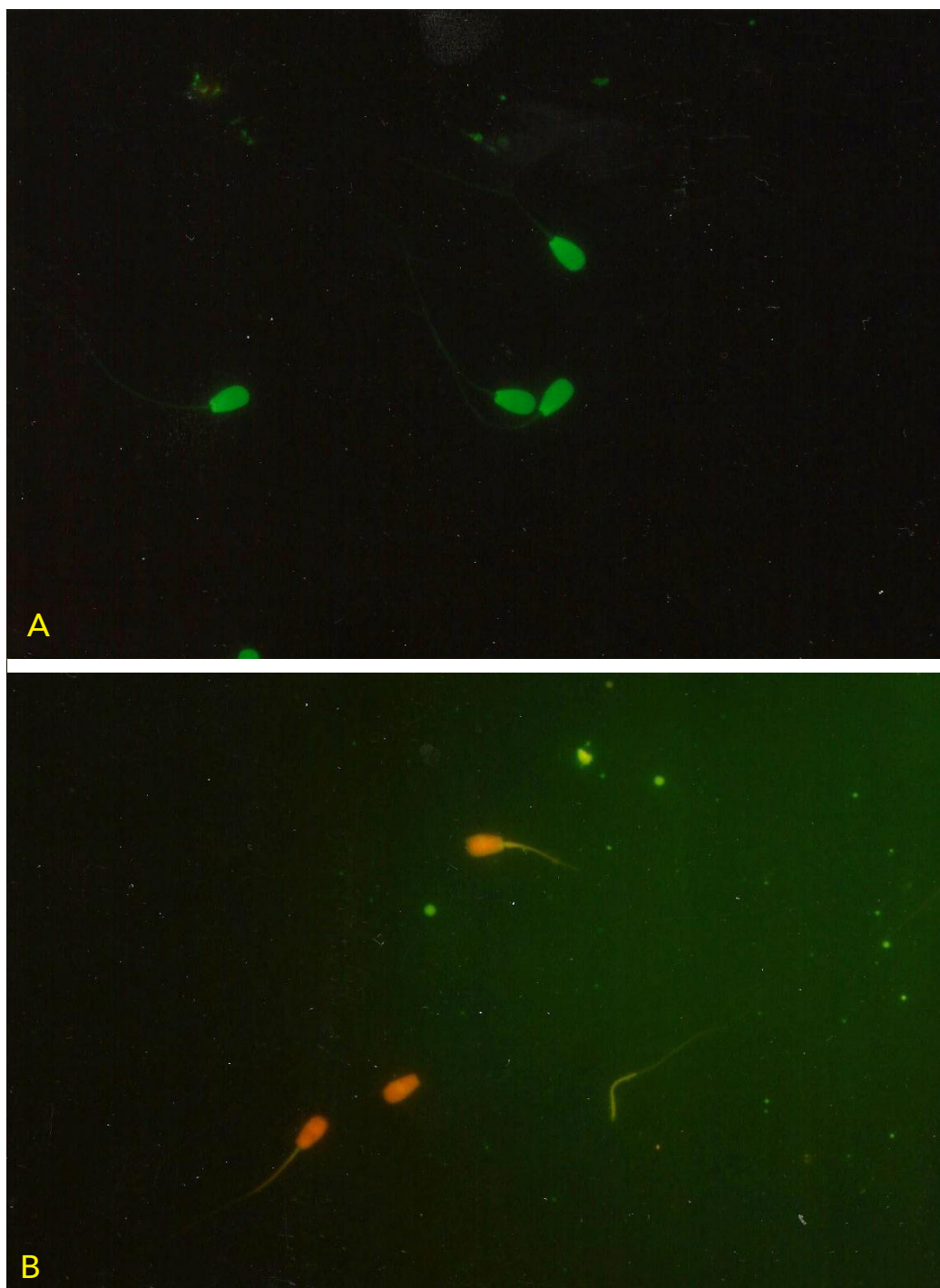


Foto: Elisa Ribeiro da Cunha

**Figura 114.** Espermatozoides corados com corante fluorescente JC-1 para avaliação de potencial mitocondrial. Espermatozoides com peça intermediária coradas em laranja (seta branca) são classificados como com alto potencial e as coradas em verde (seta azul) como com baixo potencial. Microscopia fluorescência (aumento de duzentas vezes).



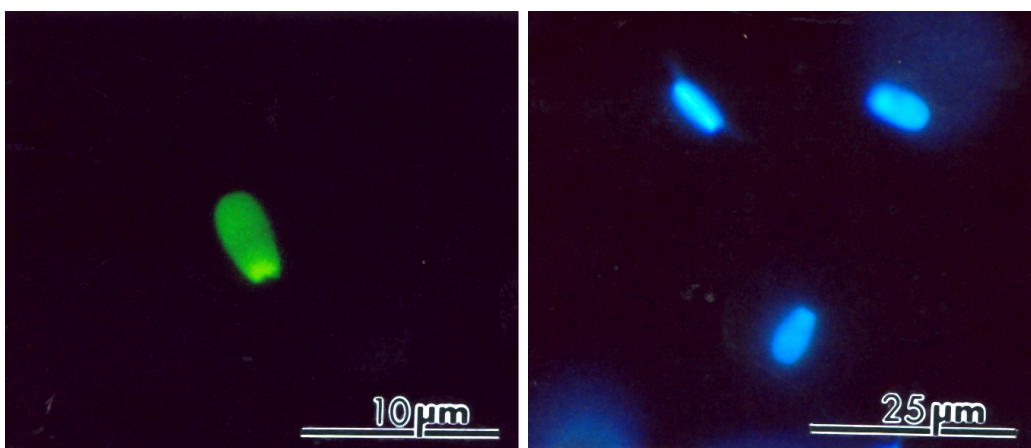
Fotos: Carlos Frederico Martins

**Figura 115.** Espermatozoides corados com alarajado de acridine para avaliação de integridade de cromatina. Espermatozoides com cabeças coradas de verde (A) são considerados com cromatina íntegra e em laranja (B) com cromatina danificada. Microscopia de epifluorescência (aumento de duzentas vezes).



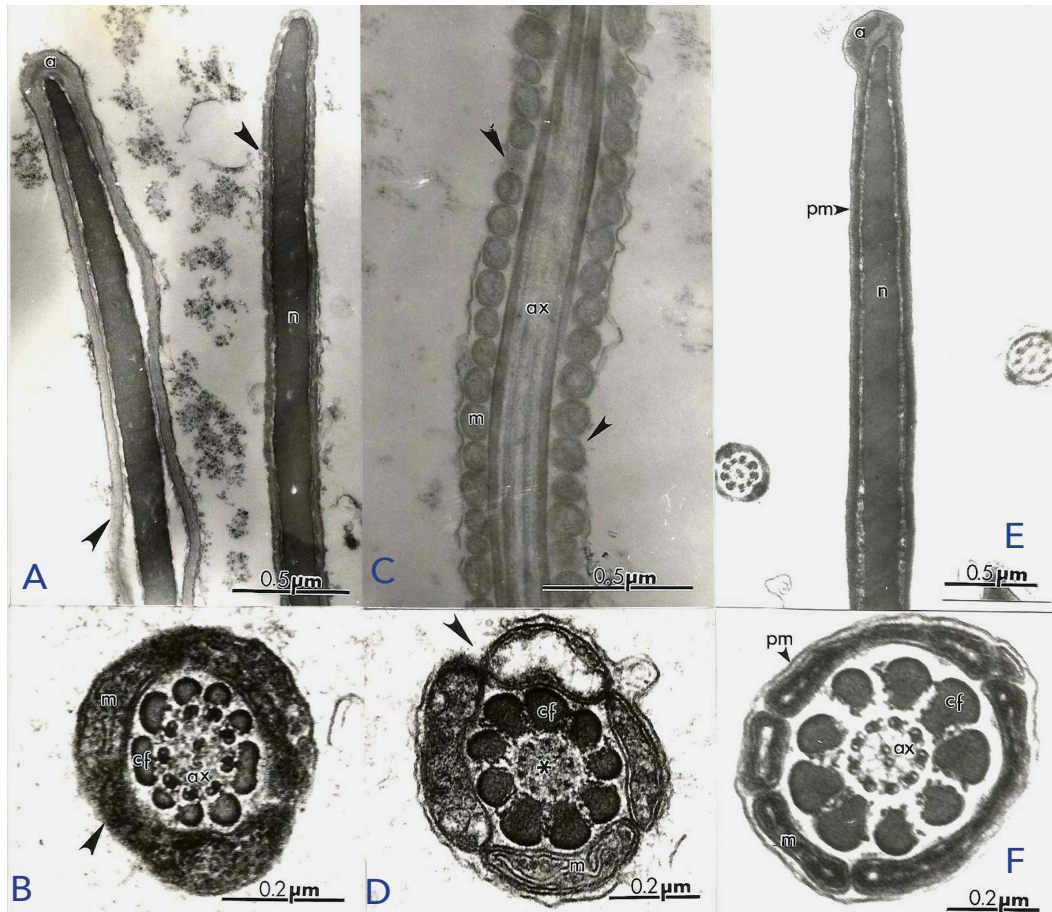
Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 116.** Espermatozoides corados com alaranjado de acridine para avaliação de integridade de cromatina. Espermatozoides com cabeças coradas de verde são considerados com cromatina íntegra e em laranja (seta) com cromatina danificada. Microscopia de epifluorescência (aumento de quatrocentas vezes).



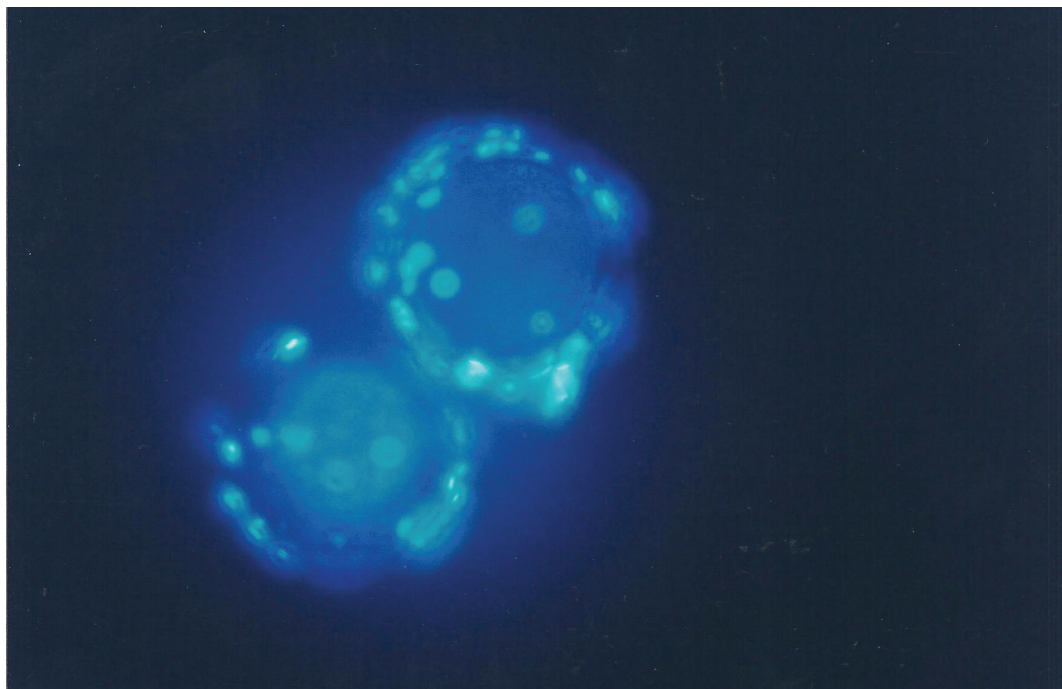
Fotos: Carlos Frederico Martins

**Figura 117.** Espermatozoides corados pelo método de TUNEL para avaliação de fragmentação de DNA. Espermatozoide com cabeça corada em verde apresenta DNA fragmentado e os espermatozoides corados de azul (DNA genômico) representam o controle positivo da técnica. Microscopia de epifluorescência (aumento de duzentas vezes).



Fotos: Carlos Frederico Martins

**Figura 118.** Espermatozoides bovinos liofilizados: (A) espermatozoides com lesão de membrana plasmática (setas) e núcleo (n) e acrossoma (a) intactos; (B) espermatozoide com membrana plasmática danificada (seta), mitocôndrias (m) e axonema (ax) intactos; (C) espermatozoide com membrana plasmática danificada (seta) e mitocôndrias intactas (m); (D) espermatozoide com microtúbulos (\*) e mitocôndrias (m) desorganizadas; (E) espermatozoide com membrana plasmática (seta pm), acrossoma (a) e núcleo (n) intactos; (F) espermatozoide apresentando membrana plasmática (seta pm), mitocôndrias (m), fibras (cf) e axonema (ax) intactos. Foto de microscopia eletrônica de transmissão.



Fotos: Carlos Frederico Martins

**Figura 119.** Teste de ligação espermática com corante fluorescente Hoescht. Observar espermatozoides fluorescentes em azul ao redor do ovócito em campo escuro. Microscopia de epifluorescência (aumentada duzentas vezes).



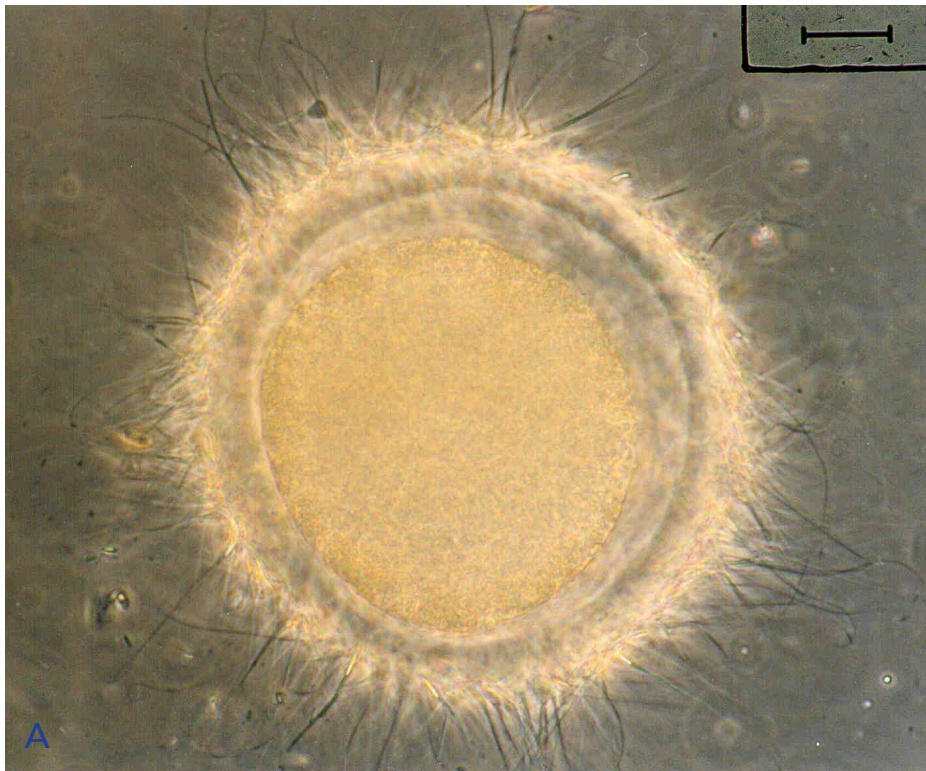


Foto: Margot Alves Nunes Dode

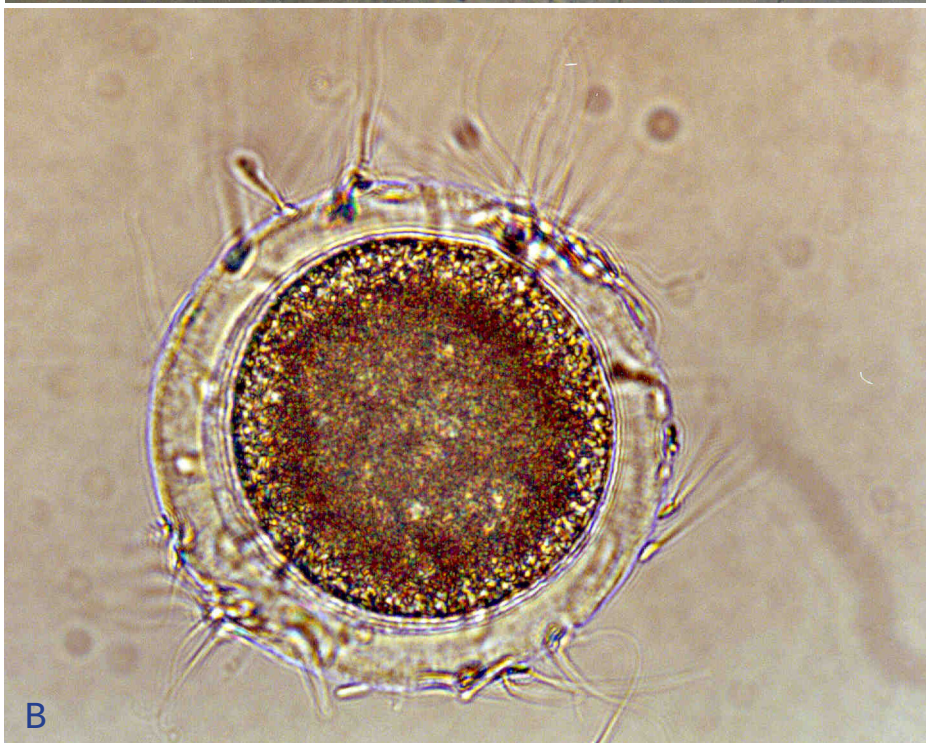


Foto: Carlos Fredrico Martins

**Figura 120.** Teste de ligação de espermatozoides bovinos à zona pelúcida. Observar a grande quantidade de espermatozoides ligados (A) e quantidade considerada normal (B) (aumento de duzentas vezes).

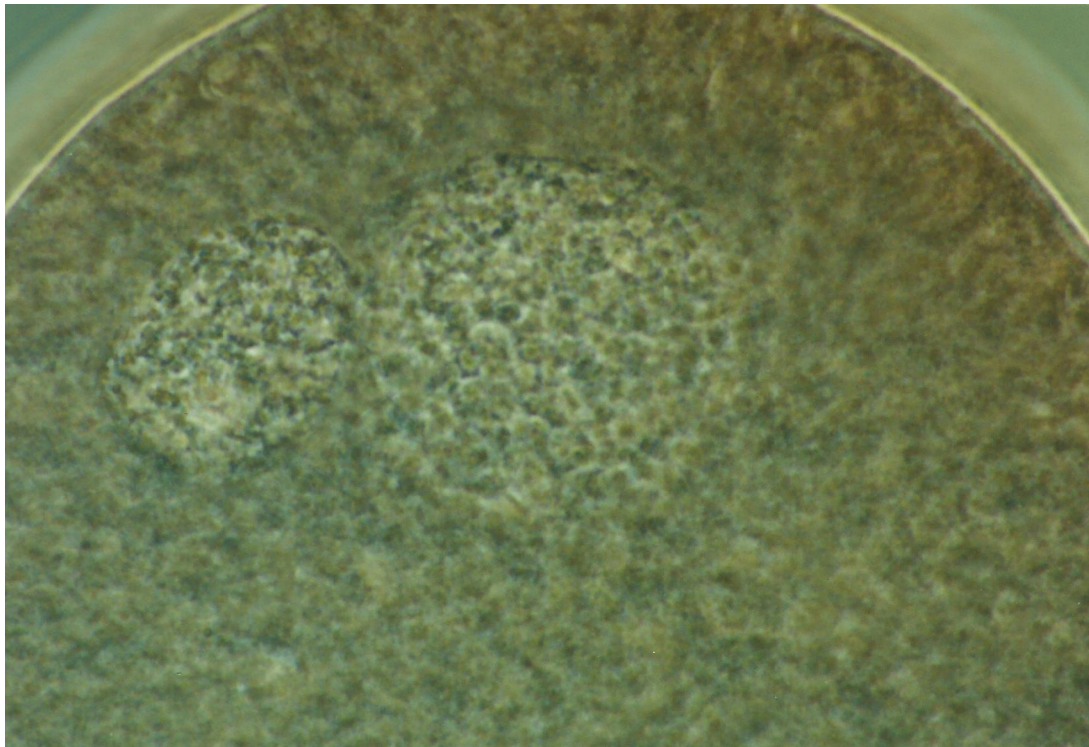


Foto: Carlos Frederico Martins

**Figura 121.** Teste de fecundação do ovócito, corado com lacmoide a 45% em ácido acético. Presença de dois pró-núcleos (feminino e masculino), indicando penetração espermática e descondensação do material genético dos dois gametas. Microscopia de campo claro (aumento de cem vezes).

