

RESUMO

Num estudo realizado com sêmen colhido pelo método de eletroejaculação em cinco tourinhos mestiços zebu-taurino, o "knobbed acrosome" variou de 23,2% a 70,2% como valor médio obtido após cinco colheitas de cada animal. Os aspectos físicos do sêmen não se mostraram prejudicados pela alta incidência desta patologia, a qual se mostrou constante entre as várias colheitas realizadas no mesmo animal.

PALAVRAS-CHAVE: *Patologia espermática; Sêmen; Touro; Defeito de acrosoma.*

1 – INTRODUÇÃO

As células espermáticas são submetidas constantemente a intensa investigação. Muitos detalhes relacionados com as estruturas observadas no funcionamento destas células são motivos freqüentes de especulações. As investigações da morfologia do espermatozóide têm proporcionado um quadro notável das estruturas de um organismo diminuto que é capaz de movimentos e processos metabólitos essenciais, com independência dos tecidos que os formaram.

Uma variedade de anormalidades pode estar presente em ejaculados de touros férteis. WILLIAMS (1925) e LAGERLOF (1934) consideravam, para sêmen de touros com fertilidade normal, até 20% de anormalidades espermáticas. Entretanto, há casos de sêmen com patologia total acima de 30% sem afetar a fertilidade (LAING, 1945). Cuidadosa atenção deve ser dada aos defeitos de cabeça das células espermáticas, particularmente quando estes estão associados com fertilidade reduzida ou esterilidade (COULTER et alii, 1978).

O presente trabalho tem como objetivo descrever a ocorrência, em alta porcentagem, do defeito espermático denominado "Knobbed sperm" em cinco touros mestiços zebu-taurino.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

O termo "Knobbed" foi usado por DONALD & HANCOCK (1953) para descrever anormalidades no acrossomo de espermatozóides de touros com fertilidade comprometida.

O "Knobbed sperm" foi descrito por BUTTLE & HANCOCK (1965), BANE & NICANDER (1966) e ANDERSEN (1974) em suínos; HANCOCK (1949), BLOM & BIRCH-ANDERSEN (1962), VALE FILHO (1974) e

BARTH (1986) em bovinos; OTT et alii (1982) e SAVAGE (1984) em ovinos, como causa de origem genética. OTT et alii (1982) descreveram casos de varicocele em carneiro a qual causou degeneração testicular, e o espermogram mostrava alta porcentagem de "Knobbed sperm". Pa BARTH (1986), a causa é genética quando a maioria de espermatozóides no ejaculado apresenta o defeito, não tendo outro sinal de distúrbio na espermatogênese. Entretanto, quando poucos espermatozóides da amostra apresentam esta alteração em associação com alta incidência de outros defeitos, a etiologia poderá ser devido a distúrbio na espermatogênese.

O desenvolvimento anormal do acrossomo ocorre durante a espermiogênese, quando as espermátides sofrem várias transformações originando os espermatozóides. O "Knobbed sperm" forma-se a partir de uma simples dobra de membrana sobre a projeção acrossômica, resultado da invasão do citoplasma da célula de Sertoli contra o vacúolo acrossômico (BANE & NICANDER, 1966; SAACKE et alii, 1968). Na formação do sistema acrossômico podemos observar os estágios de Golgi, capuz, acrossômico e maturação. As anormalidades aparecem principalmente em três deles: a) no estágio de capuz, quando a espermátide ainda esférica sofre invaginação da membrana anterior do capuz acrossômico concomitante com o afundamento do grânulo, formando uma depressão; b) no estágio acrossômico, havendo retardamento nesta fase, onde a espermátide está se alongando, como um processo assimétrico, extensivo, curvado para dentro da célula de Sertoli; c) durante o estágio de maturação, pela persistência da parede do acrossomo, normalmente presente somente no final deste estágio (BANE & NICANDER, 1966; OTT et alii, 1982).

ANDERSEN (1974) sugeriu ser o acrossomo um lisossomo especializado o qual está envolvido diretamente com a fertilização. Defeitos nesta estrutura, sozinho ou

^a. Departamento de Clínica Veterinária – CCA/Universidade Estadual de Londrina.

associados com outras anormalidades, estão relacionados na maioria das vezes com baixa fertilidade.

BUTTLE & HANCOCK (1965) dirigiram um estudo no sentido de testar a capacidade fecundante de espermatozoides de suínos portadores de "Knobbed sperm". Estas células não tinham capacidade de penetrar na zona pelúcida do óvulo, apesar de abundante material acrossômico existente, devido a ausência da enzima hialuronidase, importante na fertilização.

A ocorrência do "Knobbed sperm" é muito variável, geralmente atinge alta proporção de espermatozoides no ejaculado e neste caso está associado com esterilidade total. Uma frequência de 1 a 2% de acrossomos anormais pode ser encontrado em ejaculados de animais com fertilidade normal (BANE & NICANDER, 1966; BARTH, 1986).

BLOM (1973) classificou os defeitos espermáticos em maiores e menores. O "Knobbed sperm" é um defeito maior, devido seu drástico efeito sobre a fertilidade.

VALE FILHO (1974) encontrou 7 touros portadores de defeito de acrossomo, onde quatro apresentaram a predominância do "Knobbed sperm". Dos quais, um pai e dois filhos, todos da raça Guzará. Outros três animais apresentaram este defeito associado com acrossomo enrugado e formações de vesículas.

CRAN & DOTT (1976) descreveram a ultra-estrutura do "Knobbed sperm" presente no espermatozoide do touro. Havia uma protuberância formada pelo acrossomo ao longo da crista do espermatozoide. Pequenas vesículas, claramente originadas da membrana acrossômica externa, eram encontradas adjacente ao núcleo. A porção apical compreende dois lóbulos, um maior interno e outro menor externo. Eles são limitados pela membrana acrossômica, a qual é, por sua vez, envolvida pela membrana plasmática. A porção posterior do lóbulo menor frequentemente funde-se com o maior, resultando numa longa vesícula.

BLOM & BIRCH-ANDERSEN (1962) examinaram o sêmen de um touro, o qual apresentou no primeiro e segundo ejaculado, respectivamente, 87,4% e 87,2% de anormalidade típicas do "Knobbed sperm". Outras alterações morfológicas foram de 2,4% no primeiro ejaculado e 2,0% no segundo. A motilidade em ambas as colheitas permaneceu em torno de 60% e a concentração espermática foi considerada normal pelos autores em ambos ejaculados examinados.

Em garanhões portadores de espermatozoides com alterações de acrossoma, HURTTGEN & JOHNSON (1982) encontraram 27 a 74% de células anormais, com taxa de prenhez variando entre 12,5 a 100%.

MILLER et alii (1982) estudaram ejaculados de touros com baixa fertilidade em monta natural e inseminação artificial. A motilidade oscilou de 60 a 80%, a concentração espermática variou de 350 a 600 milhões de células por mm^3 , e finalmente a morfologia espermática acusou aberrações de acrossomo em 80% das células.

OTT et alii (1982) examinaram ejaculados de carneiro com varicocele bilateral. O sêmen colhido com eletroejaculador apresentou vários tipos de patologia, com des-

taque para o "Knobbed sperm", chegando a 50%. Os demais defeitos caracterizaram quadro de degeneração testicular. A motilidade variou de 20 a 40% nas diversas colheitas realizadas.

SAVAGE (1984) verificou a predominância do "Knobbed sperm" no sêmen de carneiro, atingindo cifras de 78% no primeiro ejaculado e 80% no segundo. Aproximadamente 50% dos espermatozoides com este defeito apresentaram gota protoplasmática distal associada. A motilidade foi de 80% e a concentração de 4×10^6 espermatozoides por mm^3 .

De 2.054 touros de corte examinados, BARTH (1986) encontrou o defeito "Knobbed sperm" em 16 animais, e as células espermáticas acometidas variaram de 16 a 100%. O autor verificou alta incidência na raça Charoleza. Animais com elevada patologia de acrossomo no ejaculado, através de teste de cruzamento, apresentaram subfertilidade ou esterilidade. A concentração sofreu pouca variação entre os animais examinados. A motilidade variou entre animais e entre colheitas, sendo classificada como muito boa, boa e regular. O movimento em massa e a intensidade de movimento individual variou conforme a motilidade.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 5 touros mestiços zebu-aurino, com idade variando de 20 a 24 meses e peso corporal entre 330 a 360 quilos.

Os animais foram identificados através de brinco numerado na orelha esquerda. Os de números 02, 16, 24 e 26 foram submetidos a cinco colheitas de sêmen cada um e o de número 21 a seis colheitas, com intervalo entre elas de 30 dias. O método utilizado foi o da eletroejaculação. Foram feitas duas tentativas para congelamento de sêmen em cada animal, mas este apresentou baixa motilidade e vigor quando em contato com o meio diluidor.

Os animais de número 16, 21 e 26 eram filhos do mesmo pai, do qual não foi possível obter-se amostra de sêmen por não se encontrar mais na propriedade.

O animal era contido em tronco próprio e o início do trabalho constava de exame clínico-genital completo através de inspeção e palpação dos órgãos genitais externos e palpação via retal dos órgãos genitais internos.

Antes de cada colheita de sêmen, os pelos do prepúcio eram cortados com tesoura e a região lavada com água morna. O mesmo era feito com a cavidade prepucial mediante o uso de pera de borracha. Para estimular a micção, o óstio prepucial era levemente massageado com dois dedos. Após a lavagem, o local era seco com papel toalha. Para estímulo elétrico utilizou-se eletroejaculador* com eletrodo de duas lâminas longitudinais, o qual foi introduzido no ânus, após seu esvaziamento. Depois de vários estímulos conseguia-se ejaculação. Muitas vezes era necessário o relaxamento do animal para liberação do ejaculado o que era conseguido através de pressão mecânica na região dorsal da porção tóraco-lombar da coluna.

* TORJET – 65 – ELETROVET, SP.

Os exames foram realizados segundo as técnicas de LAGERLOF (1934 e 1964) e BLOM (1973 e 1983). O volume foi obtido diretamente com o uso de tubos graduados; e turbilhonamento ou movimento em massa dos espermatozoides, variando numa escala de zero a cinco, foi observado numa lâmina com uma gota de sêmen sem o uso de lamínula e aumento de 50 X; a motilidade, dada em porcentagem como o número de células móveis, foi observada com a utilização de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, com aumento de 100 X; o vigor ou intensidade de movimento individual, foi verificado entre lâmina e lamínula com aumento de 400 X, variando numa escala de zero a cinco. Todo o material utilizado para análise do sêmen era mantido à temperatura de 36 a 38 graus C, evitando-se assim choque térmico do sêmen ao ser examinado. Para exame da concentração, em frasco contendo 4ml de solução formol-salina tamponada, adicionou-se o conteúdo de uma pipeta de Sahli, equivalente a 0,02ml de sêmen conseguindo-se a diluição de 1:200, sendo o material identificado para posterior exame em câmara de Neubauer, antes tomando-se o cuidado de homogeneizar delicadamente o material. Para microscopia em contraste de fase, utilizou-se frasco contendo 1,0ml de solução formol-salina tamponada e com o auxílio de pipeta de Pasteur colocou-se tantas gotas quantas necessárias para turvar o meio. O material assim conservado era identificado e examinado em microscópio de contraste de fase, em preparação úmida (HANCOCK, 1957), sob imersão, com aumento de 1000 X, contando-se 200 células em diferentes campos da preparação. Logo após cada colheita, foram feitos três esfregaços de sêmen, em camada bem delgada, para permitir a visualização adequada das células. As lâminas assim preparadas, eram identificadas e coradas segundo a técnica descrita por CEROVSKY (1976), modificada para bovino (a lâmina com esfregaço de sêmen permanecia mergulhada na solução de violeta de genciana a 0,5% durante 10 segundos). Foram contadas 200 células de cada amostra em microscópio binocular com aumento de 1000 X. Os resultados obtidos foram anotados em fichas próprias e os valores expressos em porcentagens.

4 - RESULTADO E DISCUSSÃO

O "Knobbed sperm" atinge altas porcentagens de espermatozoides no ejaculado, conforme descrito por BARTH (1986), estando de acordo com nossas observações conforme demonstra a TABELA I, onde os valores médios, obtidos de cinco colheitas de sêmen de cada animal, variaram de 23,2 a 70,2%.

A alteração observada, na maioria das vezes, mostrava-se como uma projeção existente no ápice da cabeça da célula espermática, evidenciando um ponto escuro e refringente quando visto ao microscópio de contraste de fase, havendo semelhança dos casos descritos por BLOM & BIRCH-ANDERSEN (1962), OTT et alii (1982), SAVAGE (1984) e BARTH (1986). Em lâmina corada pela técnica descrita por CEROVSKY (1976) esta estrutura persistia como um ponto escuro não apresentando aspecto refringente, confundindo muitas vezes com precipitados no es-

fregaço, não sendo possível sua diferenciação.

A TABELA II mostra as características físicas individuais de ejaculados dos animais com espermatozoides portadores do "Knobbed sperm". Estes valores são correspondentes à média individual de cinco colheitas de sêmen, realizadas pelo método de eletroejaculação

TABELA I: Variação nas características morfológicas individuais de ejaculados de tourinhos mestiços, obtidos por eletroejaculação

Patologia Espermática (%)	Número do Animal				
	02	16	21	24	26
Cabeça	11,8	10,0	5,6	3,3	7,0
Peça Intermediária	2,6	—	—	—	1,2
Cauda	0,8	4,2	4,3	3,6	5,0
Gôta Protoplasm. Proximal	8,2	7,2	9,0	3,6	5,2
Gôta Protoplasm. Distal	1,2	2,2	2,3	1,2	1,4
Knobbed Acrosome	23,2	31,0	60,8	29,4	70,2
Cabeça Isolada	1,6	3,5	—	4,4	—

TABELA II: Valores médios individuais das características físicas de ejaculados de tourinhos mestiços, obtidos por eletroejaculação

Aspectos físicos	Número do Animal				
	02	16	21	24	26
Volume (ml)	4,8	4,8	5,25	6,4	3,4
Turbilhonamento (0-5)	1,2	1,2	1,0	1,6	1,0
Motilidade (%)	52,0	60,0	62,0	70,0	60,0
Vigor (0-5)	2,4	2,8	2,6	3,4	3,2
Concentração ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	302,0	263,6	286,6	370,8	371,0

Ao exame clínico-genital não foi observada qualquer alteração nestes animais, estando de acordo com BANE & NICANDER (1966), MILLER et alii (1982) e BARTH (1986), mas diferindo de OTT et alii (1982) que encontrou os testículos flácidos, varicocele bilateral com o quadro espermático revelando degeneração testicular.

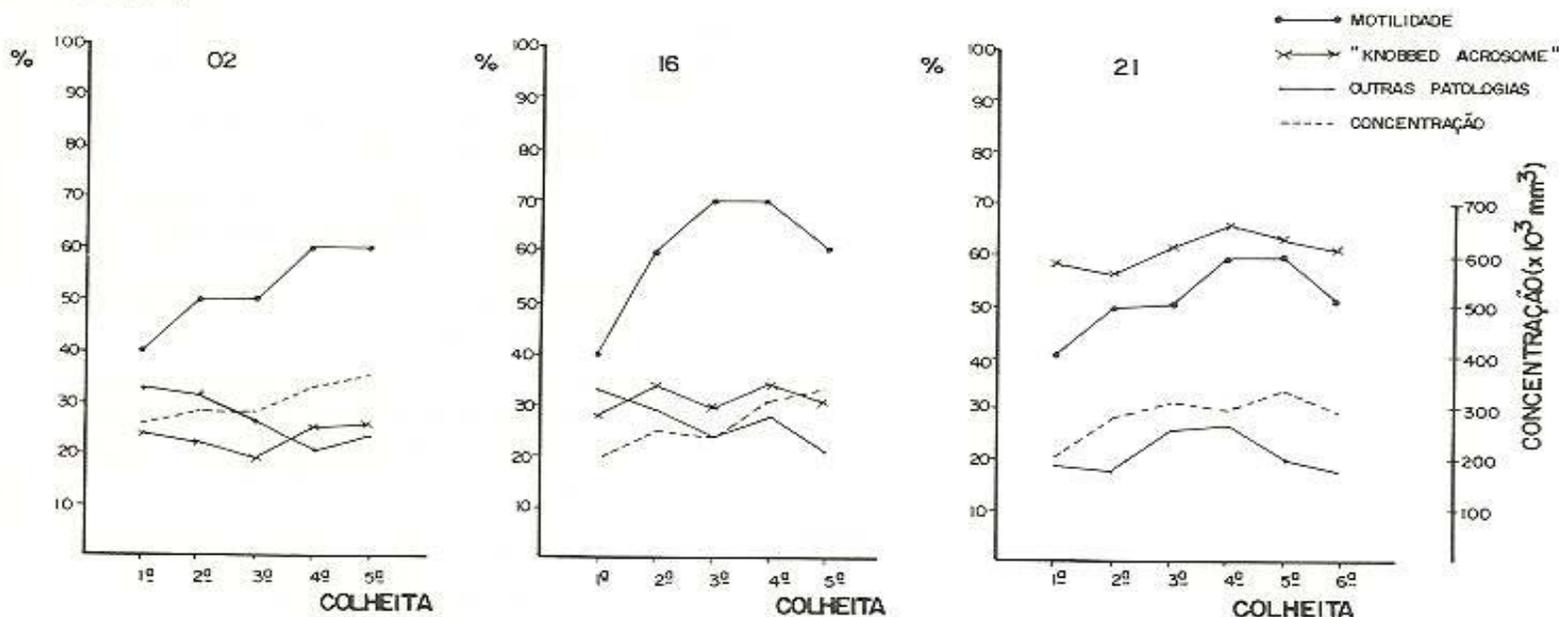
Dentre as características físicas do sêmen, a motilidade espermática não se mostrou afetada pela presença de alta patologia de acrossomo. Entre os animais examinados ela variou de 52 a 70% (TABELA II) estando de acordo com BLOM & BIRCH-ANDERSEN (1962) com 60%, MILLER et alii (1982) variando de 60 a 80%, SAVAGE (1984) com 80% e BARTH (1986), classificada como muito boa para alguns animais. A motilidade se mostrou alterada para OTT et alii (1982) com variações de 20 a 40% e para BARTH (1986) com variações de regular a boa para certos animais. Os animais 21 e 26 apresentaram 60,8 a 70,2% de "Knobbed sperm" e a motilidade de 62 e 60%, respectivamente, conforme podemos observar no GRÁFICO I.

Existem fortes evidências que esta patologia seja de origem genética. Neste estudo tivemos a ocorrência do defeito em 3 touros filhos do mesmo pai, estando em concordância com VALE FILHO (1974) que observou o defeito em um pai e dois filhos, todos manifestando baixa fertilidade.

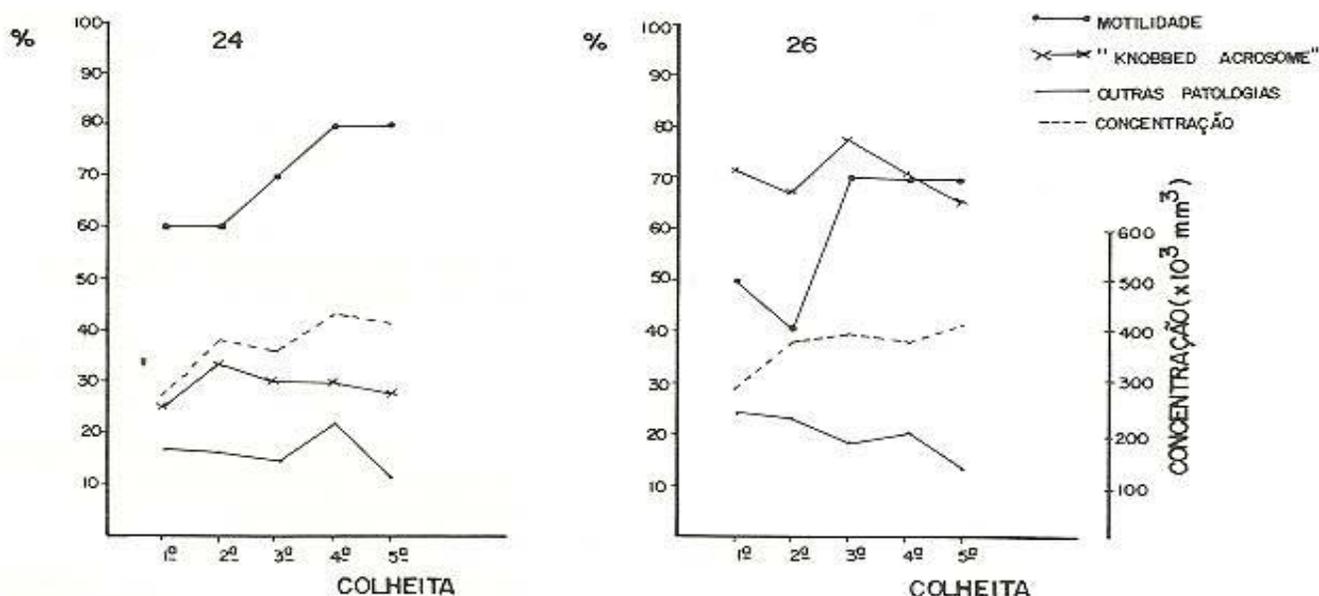
Os animais de número 02, 16 e 21 apresentaram gota protoplasmática proximal acima dos limites normais.

BLOM (1973) evidenciou um valor máximo de 5% para esta patologia espermática em espermograma de touros normais. Possivelmente este valor encontrado para este defeito esteja relacionado com a idade dos animais, não tendo completado, ainda, a maturidade sexual.

GRÁFICO 1



Variação nos aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros mestiços, de números 02, 16 e 21, respectivamente, obtido por eletroejaculação.



Variação nos aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros mestiços, de números 24 e 26, respectivamente, obtido por eletroejaculação.

Variação nos aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros mestiços, de números 02, 16, 24 e 26, respectivamente, obtido por eletroejaculação

5 - CONCLUSÕES

- A presença do "Knobbed sperm" foi caracterizada

em cinco reprodutores mestiços zebu-aurino.

- A condição hereditária foi reconhecida em 3 dos reprodutores por serem filhos do mesmo pai.

- A coloração com vermelho congo não se mostrou eficiente para caracterizar esta patologia espermática.

- O "knobbed sperm" não interfere nos aspectos físicos do sêmen e se mostrou de forma constante entre as várias colheitas realizadas no mesmo animal.

ABSTRACT

In this study about semen collection using the method of electroejaculation in five zebu-taurino half breed bulls, the variation of the "Knobbed acrosome" medium value ranged from the rate of 23,2% to 70,2%, obtained after five collects for each animal. The semen physical aspects were not prejudiced by the high incidence of this pathology, which is constant among the collections in the same animal.

KEY WORDS: Spermatozoa abnormality; Semen; Bull; Acrosome defect.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – ANDERSEN, K. Morphological abnormalities in the acrosome and nucleus of boar spermatozoa. *Nord. Veterinaermed., Copenhagen*, 26(3-4):215-18, 1974.
- 2 – BANE, A.; NICANDER, L. Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J. Repr. Fertil., Cambridge*, 11(1): 133-38, 1966.
- 3 – BARTH, A.D. The Knobbed acrosome defect in beef bulls. *Can. Vet. J., Ottawa*, 27(10): 379-84, 1986.
- 4 – BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed., Copenhagen*, 25:383-91, 1973.
- 5 – BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs in the semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, 1958-1982. *Nord. Veterinaermed., Copenhagen*, 35(3): 105-30, 1983.
- 6 – BLOM, E.; BIRCH-ANDERSEN, A. Ultrastructure of the sterilizing "Knobbed sperm" defect in the bull. *Nature, London*, 194:989-90, 1962.
- 7 – BUTTLE, H.; HANCOCK, J.L. Sterile boars with "Knobbed" spermatozoa. *J. Agric. Sci., Cambridge*, 65(2):255-60, 1965.
- 8 – CEROVSKY, J. A new staining procedure for boar spermatozoa. *Zivocisna Vyroba, Prague*, 21(5):361-6, 1976.
- 9 – COULTER, G.H.; OKO, R.J.; COSTERTON, J.W. Incidence and ultrastructure of "crater" defect of bovine spermatozoa. *Theriogenology, Los Altos*, 9(2):165-73, 1978.
- 10 – CRAN, D.G.; DOTT, H.M. The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. *J. Repr. Fertil., Cambridge*, 47(2): 407-8, 1976.
- 11 – DONALD, H.P.; HANCOCK, J.L. Evidence of a gene-controlled sterility in bulls. *J. Agric. Sci., Cambridge*, 43:178, 1953.
- 12 – HANCOCK, J.L. Evidence of an inherited seminal character associated with infertility of Frisian bulls. *Vet. Rec., London*, 61:308-9, 1949.
- 13 – HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J.R. Microsc. Soc. London*, 76:84-97, 1957.
- 14 – HURTGEN, J.P.; JOHNSON, L.A. Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome. *J. Repr. Fertil., Cambridge*, 32 (Suppl.):15-22, 1982.
- 15 – LAGERLOF, N. Morphologische undersøchungen über veränderungen in spermabild und in den hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilität. *Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. 19 (Tese) Uppsala*, 1934. 257 p.
- 16 – LAGERLOF, N. Semen examination as an aid to sexual health control in domestic animal breeding. *Int. J. Fertil., St. Lawrence*, 9(2):377-82, 1964.
- 17 – LAING, A. Observations on the characteristics of the semen in relation to fertility in the bull. *J. Agric. Sci., Cambridge*, 35:1-24, 1945.
- 18 – MILLER, D.M.; HRUDKA, F.; CATES, W.F.; MAPLETOFT, R.J. Infertility in a bull with a nuclear sperm defect: a case report. *Theriogenology, Los Altos*, 17(6):611-21, 1982.
- 19 – OTT, R.S.; HEATH, E.H.; BANE, A. Abnormal spermatozoa, testicular degeneration and varicocele in a ram. *Am J. Vet. Res., Schaumburg*, 42(2):241-5, 1982.
- 20 – SAACKE, R.G.; AMANN, R.P.; MARSHALL, C.E. Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls. *J. Anim. Sci., Champaign*, 27 (5): 1391-400, 1968.
- 21 – SAVAGE, N.C. Infertility in a ram associated with a knobbed acrosome abnormality of the spermatozoa. *Can. Vet. J., Ottawa*, 25: 126-7, 1984.
- 22 – VALE FILHO, V.R. Aspectos genéticos da subfertilidade e infertilidade dos touros. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte, 1974. *Anais...* Belo Horizonte, 1974. p. 20-30.
- 23 – WILLIAMS, W.W. Tecniqne of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Vet., Ithaca*, 10:87-95, 1920.

Recebido para publicação em 28/2/89