



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**HELEN DA SILVA ANDRADE**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLORAÇÃO SOBRE A  
MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE CAPRINOS**

**FORTALEZA**

**2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

HELEN DA SILVA ANDRADE

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLORAÇÃO SOBRE A  
MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE CAPRINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Zootecnia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Nascimento Campos.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A567i Andrade, Helen da Silva.  
Influência de diferentes métodos de coloração sobre a morfologia espermática de caprinos / Helen da Silva Andrade. – 2023.  
22 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Zootecnia, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Ana Cláudia Nascimento Campos.
1. Capra aegagrus hircus. 2. Avaliação espermática. 3. Defeitos maiores. 4. Defeitos menores. I. Título.  
CDD 636.08
-

HELEN DA SILVA ANDRADE

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLORAÇÃO SOBRE A  
MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE CAPRINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Zootecnia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Zootecnia.

Aprovado em: 03/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Nascimento Campos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Renata Figueiredo Gadelha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Msc Bruno Ramires Macedo Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar se os diferentes tipos de corantes utilizados promovem alterações na morfologia das células espermáticas de caprinos. Foram utilizados três caprinos inteiros e maduros sexualmente, com peso corporal médio de 45,8kg. Os ejaculados foram coletados semanalmente com auxílio de uma fêmea em estro natural e de uma vagina artificial. Foram realizadas 10 coletas e de cada amostra de ejaculado foram confeccionados três esfregaços em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com Azul de Bromofenol (AB), Eosina-Nigrosina (EN) e Panótico Rápido (PO). Dez lâminas com esfregaços de sêmen foram confeccionadas com cada corante, identificadas (animal/corante/ dia de coleta) e 200 espermatozoides foram observados por lâmina, totalizando 2.000 células/ corante. As lâminas foram visualizadas sob microscópio óptico e as imagens dos espermatozoides foram digitalizadas. Os espermatozoides foram classificados em Normais e as alterações morfológicas foram classificadas em Defeitos Maiores e Defeitos Menores. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA para verificar o efeito da coloração sobre a morfologia dos espermatozoides de caprinos pelo programa estatístico SAS. Quando constatadas diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. Foram observados diferentes padrões de coloração entre os corantes utilizados e diferenças significativas nos métodos de coloração empregados ( $P < 0,05$ ) sobre a morfologia espermática de caprinos. O índice de defeitos maiores de AB não diferiu estatisticamente de PO, entretanto houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparados com EO. Observa-se aumento no número de espermatozoides normais para AB, embora não tenham sido observadas diferenças significativas para PO. No entanto, EO apresentou menores valores ( $P < 0,05$ ) para espermatozoides normais quando comparado a AB. Conclui-se que os corantes Azul de Bromofenol, Eosina-nigrosina e Panótico Rápido alteram a morfologia espermática de caprinos, com efeitos mais significativos observados na Eosina-nigrosina.

**Palavras-chave:** *Capra aegagrus hircus*; avaliação espermática; defeitos maiores; defeitos menores.

## ABSTRACT

The aim of this study was to verify whether the different types of dyes used promote changes in the morphology of goat sperm cells. Three sexually mature goats, with an average body weight of 45.8 kg, were used. Ejaculates were collected weekly using a female in natural estrus and an artificial vagina. Ten collections were performed and three smears were prepared from each ejaculate sample on histological slides. The slides were stained with Bromophenol Blue (AB), Eosin-Nigrosin (EO) and Rapid Panotic (PO). Ten slides with semen smears of each dye were identified (animal/dye/day of collection) and 200 spermatozoa/slide were observed, totaling 2,000 cells/dye. The slides were viewed under an optical microscope and the spermatozoa images were digitized. The spermatozoa were classified as Normal and the morphological alterations were classified as Major Defects and Minor Defects. The data obtained were submitted to ANOVA to verify the effect of staining on the morphology of goat spermatozoa using the SAS statistical program. When significant differences were found between treatments, the averages were compared using the Tukey test at 5% significance. Different staining patterns were observed between the dyes used and significant differences in the staining methods employed ( $P < 0.05$ ) on sperm morphology in goats. The rate of major defects in AB did not differ statistically from PO, however there was a significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with EO. There is an increase in the number of normal spermatozoa for AB, although no significant differences were observed for PO. However, EO showed lower values ( $P < 0.05$ ) for normal sperm when compared to AB. It is concluded that the eosin-nigrosin staining method induces alterations in goat sperm cells, being directly influenced by the fixation and staining procedure.

**Keywords:** *Capra aegagrus hircus*; morphological evaluation; major defects; minor defects.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia dos espermatozoides de caprinos corados com: a) AB, b) EO e c) PO .....	13
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de defeitos maiores e menores (Blom, 1973) .....	11
Tabela 2 – Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos, corados com Azul de bromofenol (AB), Eosina-nigrosina (EN) e Panótico rápido (PO).....	14
Tabela 2 – Valores absolutos das células espermáticas de caprinos, coradas com Azul de bromofenol (AB), Eosina-nigrosina (EN) e Panótico rápido (PO).....	14



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Coleta e processamento do sêmen</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Coloração das lâminas</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>17</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>18</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A seleção precoce de reprodutores é uma etapa crucial para alcançar resultados satisfatórios em termos de fertilidade (BASTOS *et al.*, 2015). Assim, a utilização de animais comprovadamente férteis auxilia na obtenção de melhores índices no manejo reprodutivo. Dentre os índices reprodutivos avaliados está a avaliação da morfologia espermática, visto que consiste no estudo micro-anatômico das células espermáticas e é provavelmente a melhor fonte de informação sobre a fertilidade masculina (BANASZEWSKA *et al.*, 2015).

O estudo morfológico constitui-se em um fator chave na reprodução de mamíferos, que por sua vez depende da qualidade das células germinativas produzidas (KONDRACKI *et al.*, 2017). Um espermatozoide é considerado normal se a forma e o tamanho da cabeça, peça intermediária e flagelo estiverem dentro da classificação adotada para uma determinada espécie (CZUBASZEK *et al.*, 2019). Entretanto, a morfologia do espermatozoide é variada, pois dentro da mesma espécie e no mesmo ejaculado podem ser observados espermatozoides de várias formas, tamanhos e aspectos (BANASZEWSKA *et al.*, 2015); tais características, dificultam o diagnóstico preciso de fertilidade (GAGO *et al.*, 2005; KONDRACKI *et al.*, 2017). Os fatores extrínsecos ao animal podem contribuir para a variação morfológica, como o método de coleta (TAPALOAGA e TAPALOAGA, 2016), a manipulação humana inadequada e as mudanças ambientais durante o processamento do sêmen ou na escolha da técnica de avaliação morfológica (ROCHA *et al.*, 2021).

Para a avaliação da morfologia, diferentes técnicas químicas, bioquímicas e microscópicas vêm sendo utilizadas (CZUBASZEK *et al.*, 2019). No entanto, a variabilidade de técnicas utilizadas nos laboratórios, incluindo as de coloração, pode produzir resultados discrepantes em relação à morfologia espermática (HENKEL *et al.*, 2008) e às dimensões das células germinativas (KONDRACKI *et al.*, 2017; MAREE *et al.*, 2010). A avaliação da morfologia espermática é subjetiva, pois tem como base a observação visual, podendo levar a resultados muito variados intra e interlaboratoriais (HIDALGO, 2006). Portanto, a precisão da análise morfológica depende da preparação cuidadosa, da fixação e da coloração dos espermatozoides, pois estes eventos, entre outros, podem afetar as dimensões e/ou o formato da cabeça do espermatozoide (MAREE *et al.*, 2010), evidenciando a necessidade de uma padronização da avaliação da morfologia espermática dos espermatozoides considerados normais.

Na escolha da coloração ideal, deve-se considerar aquele que induza o menor número possível de alterações na estrutura morfológica e morfométrica dos espermatozoides,

além de, evidenciar as distintas partes da célula (MAREE *et al.*, 2010). Assim, diferentes técnicas de coloração têm sido amplamente utilizadas para avaliar a morfologia dos espermatozoides em animais domésticos e humanos (COLAS, 1980; CZUBASZEK *et al.*, 2019; SERAFINI *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2013). Dentre os diversos corantes empregados, estão aqueles considerados vitais, como azul de bromofenol (MEDEIROS *et al.*, 2006), azul de tripan (NAGY *et al.*, 1999; SUTTIYOTIN e THWAITES, 1991) e eosina-nigrosina (CAMPBELL *et al.*, 1956; PEREZ-MARIN *et al.*, 2016; SUTTIYOTIN e THWAITES, 1991). Os corantes vitais diferenciam quatro categorias de espermatozoides: vivo com acrossoma intacto, vivo com acrossoma reagido ou danificado, morto com acrossoma intacto e morto com acrossoma reagido ou danificado. São corantes de fácil execução, pois exigem apenas equipamento básico e são altamente confiáveis. O corante panótico (Diff Quik) tem sido utilizado na avaliação morfológica de espermatozoides em humanos (MOSKA *et al.*, 2011), primatas (GAGO *et al.*, 2005), bovinos (BASTOS *et al.*, 2015) e ovinos (HERNÁNDEZ-CORREDOR *et al.*, 2020), apresentando vantagem na rapidez e praticidade no método de coloração.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo é verificar se os diferentes tipos de corantes utilizados promovem alterações na morfologia das células espermáticas de caprinos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no setor de Ovinocaprinocultura e no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará, Brasil), com temperatura média de 27,8°C, 3°45'02'' de latitude sul, 38°32'35'' de longitude oeste e 15,5 m acima do nível do mar.

Foram utilizados três caprinos inteiros e maduros sexualmente (Anglo Nubiano, Marota e Azul), com peso corporal médio de 45,8 kg. Os animais foram alojados em baias individuais, com acesso a solário, e submetidos ao manejo semi-intensivo. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, às 8h da manhã e às 16h da tarde, sendo composta somente por feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylum*) e água *ad libitum*. A mistura mineral foi fornecida em saleiro próprio.

### 2.1 Coleta e processamento do sêmen

Os ejaculados foram obtidos semanalmente, com auxílio de uma vagina artificial e uma fêmea. O processamento do sêmen foi realizado no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA), onde foram avaliados quanto ao volume (mL) e concentração espermática ( $\times 10^9$  spz/ mL) e posteriormente diluídos no diluidor Tris-citrato (3,63 g de tris, 0,50 g de frutose, 1,99 g de ácido cítrico e 100 mL de água destilada- qsp) a concentração final de  $100 \times 10^6$  spz/mL. Foram realizadas 10 coletas e de cada amostra de ejaculado foram confeccionados três esfregaços em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com Azul de Bromofenol, Eosina-Nigrosina e Panótico Rápido.

### 2.2 Coloração das lâminas

Para o preparo da lâmina de Azul de Bromofenol, foram depositados cuidadosamente 10  $\mu$ l de sêmen sobre uma lâmina limpa. O corante (5  $\mu$ l) foi adicionado sobre o sêmen e foram homogeneizados por 10 segundos com o auxílio de uma ponteira descartável. A lâmina foi previamente identificada com o número do animal e data da coleta. Para o corante Eosina-Nigrosina, foi adotado o mesmo procedimento descrito.

O Panótico Rápido é um kit comercial facilmente encontrado, sendo composto por 3 soluções. Para a elaboração da lâmina, foi realizado um esfregaço com 10  $\mu$ l sêmen e após a secagem, foi mergulhado por 2 min na solução azul claro (fixador), 1 min na solução vermelha

(cora estruturas básicas- acidófilos) e 1 min azul escuro (cora estruturas ácidas- basófilos), respectivamente.

Dez lâminas com esfregaços de sêmen, de cada corante, foram identificadas (animal/corante/dia de coleta) e foram observados 200 espermatozoides/lâmina, totalizando 2.000 células/corante. As lâminas com as células espermáticas foram visualizadas sob microscópio óptico e as imagens dos espermatozoides foram digitalizadas com o auxílio de uma câmera de smartphone (Redmi Note 10S- Android 13), acoplada ao microscópio por um adaptador regulável. Todas as imagens foram armazenadas em computador, em arquivos devidamente identificados. Cada imagem foi visualizada pelo programa de armazenamento de fotos Google Drive.

Os espermatozoides foram classificados em Normais ou com alterações e as alterações morfológicas foram classificadas em Defeitos Maiores e Defeitos Menores (Blom, 1973), conforme descrito na tabela 1. Entende-se por Defeitos Maiores aquelas anormalidades que têm grande efeito sobre a fertilidade e os Defeitos Menores, àqueles que forem considerados de menor importância sobre a fertilidade.

**Tabela 1-** Classificação de defeitos maiores e menores (Blom, 1973).

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

### **2.3 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA para verificar o efeito da coloração sobre a morfologia dos espermatozoides de caprinos pelo programa estatístico SAS. Quando constatadas diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

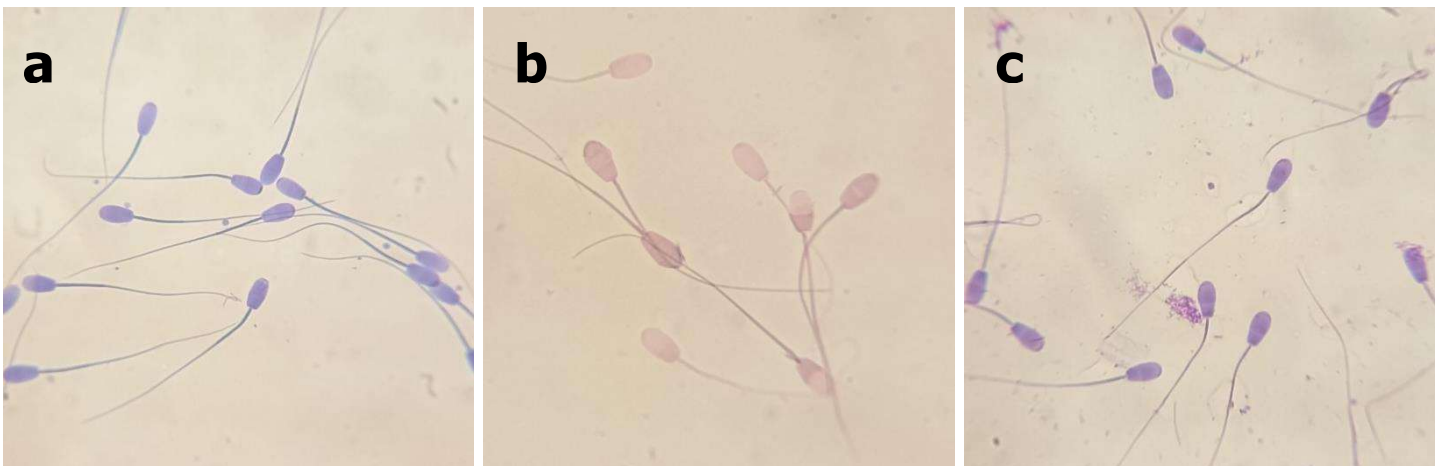
### 3 RESULTADOS

Foram observados diferentes padrões de coloração entre os corantes utilizados nesse estudo (Figura 1). Na coloração azul de bromofenol (AB), o acrossoma apresentou coloração azul claro e a região pós-acrossômica, azul escuro. A peça intermediária pigmentou-se de azul escuro, semelhante a cor encontrada na cabeça, enquanto a cauda apresentou coloração ligeiramente mais clara que a peça intermediária.

Na coloração eosina-nigrosina (EN), foi possível observar, com boa visualização, as diferentes partes dos espermatozoides, embora a coloração seja menos intensa quando comparada aos demais corantes utilizados nesse estudo. O acrossoma obteve coloração vermelho-rosado, com a região pós-acrossômica marcada pela mesma cor, entretanto, apresentou maior contraste, tornando possível distinção entre os segmentos. A peça intermediária e cauda mostraram a mesma coloração, vermelho escuro, o que dificultou a distinção entre esses segmentos dos espermatozoides.

O panóptico rápido (PO) pigmentou o acrossoma de roxo e a área pós-acrossômica de lilás, já a peça intermediária e a cauda apresentaram pigmentação semelhante ao acrossoma.

**Figura 1:** Morfologia dos espermatozoides de caprinos corados com: a) AB, b) EN e c) PO.



No presente estudo, os tipos de coloração utilizados influenciaram significativamente a morfologia espermática de caprinos (Tabela 2;  $P < 0,05$ ). Constatou-se que os valores de Defeitos maiores foram mais elevados no corante EN ( $P < 0,05$ ), os corantes AB e PO não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ). No que se refere aos Defeitos menores, não se verificou influência dos corantes sobre esse parâmetro ( $P > 0,05$ ).

O maior número de espermatozoides normais foi encontrado no corante AB ( $P < 0,05$ ), embora não tenham diferido do PO ( $P > 0,05$ ). No corante EN foram verificados os menores valores de espermatozoides normais ( $P < 0,05$ ), que também não diferiu do PO. O

percentual de anormalidades total ficou em torno de 23,80%, 34,75% e 30,1% nos corantes AB, EN e PO, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 2.** Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos corados com Azul de bromofenol (AB), Eosina-nigrosina (EN) e Panótico rápido (PO).

Parâmetros (nº de espermatozoides)	Corantes			CV (%)	P- valor
	AB	EN	PO		
Normais	152,40 <sup>a</sup>	130,50 <sup>b</sup>	139,80 <sup>ab</sup>	11,71	0,021
Defeitos maiores	29,80 <sup>b</sup>	52,10 <sup>a</sup>	35,40 <sup>b</sup>	13,12	0,001
Defeitos menores	17,80	17,40	24,80	36,77	0,277

<sup>a, b</sup> Letras sobrescritas indicam diferenças significativas entre os valores médios (P<0,05).

**Tabela 3.** Valores absolutos das células espermáticas de caprinos corados com Azul de bromofenol (AB), Eosina-nigrosina (EN) e Panótico rápido (PO).

Blom (1973)		AB	EO	PO
Classificação	Defeitos	Defeitos totais		
Normais	Espermatozoides normais	1524	1305	1398
	Acrossoma	92	240	105
Defeitos maiores	Gota citoplasmática proximal	17	8	1
	Cabeça isolada patológica	3	22	0
	Cabeça estreita na base	7	2	0
	Cabeça piriforme	2	6	6
	Cabeça pequena anormal	1	1	3
	Contorno anormal	3	38	6
	Cabeça c/ vacúolos nucleares	18	73	54
	Peça intermediária	142	105	163
	Cauda fortemente dobrada/enrolada	11	24	14
	Cauda enrolada na cabeça	0	1	2
	Cauda dobrada ou enrolada com gota	2	1	0
	Gota citoplasmática distal	20	42	9
	Cabeça curta, larga, gigante, pequena	27	26	17
	Defeitos menores	Cabeça isolada normal	83	63
Abaxial, retroaxial e oblíqua		15	10	34
Cauda dobrada ou enrolada		33	33	87



#### 4 DISCUSSÃO

Boas características da morfologia espermática em um reprodutor são importantes para obtenção de bons índices de fertilização e desenvolvimento embrionário (AKSOY *et al.*, 2012). Então, uma adequada avaliação da morfologia torna-se necessária. Nesse estudo, os corantes AB e PO permitiram uma nítida visualização das diferentes partes dos espermatozoides de caprinos, mas, essa capacidade não foi observada com o corante EN, de forma que foi impossível distinguir a peça intermediária da cauda do espermatozoide quando um aumento digital era aplicado. Essa característica pode ser atribuída à maior dificuldade na avaliação em função do pouco contraste observado entre o espermatozoide e o fundo da lâmina, conforme já constatado em outros estudos realizados com sêmen de caprino corado com eosina-nigrosina (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Apesar disso, em pequenos ruminantes, os corantes vitais, Eosina-Nigrosina e Azul de Bromofenol, continuam sendo os mais rotineiramente utilizados, pois além de permitirem a avaliação da morfologia espermática, também possibilitam a distinção e contagem dos espermatozoides vivos e mortos (MEDEIROS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Na contagem total de espermatozoides nos corantes, EN, PO e AB, foram encontrados muitos defeitos de acrossoma e peça intermediária, com 240 e 105; 105 e 163; 92 e 142, respectivamente. Na EN, também foram encontradas muitas cabeças de espermatozoides com vacúolos nucleares (73). Os achados desse experimento sugerem que os corantes induziram alterações na morfologia espermática durante a confecção das lâminas, conforme já verificado em outras pesquisas (KUSTRITZ *et al.*, 1998; OZTURKLER *et al.*, 2001).

Os valores de Defeitos maiores foram elevados no corante EN. Uma maior incidência de Defeitos Maiores, em especial o defeito de acrossoma, possivelmente induzida pela eosina-nigrosina, já foi descrito para o sêmen de ovinos (OZTURKLER *et al.*, 2001). Os autores sugeriram que, tanto o uso de maior volume do corante quanto a técnica de preparo podem deteriorar a integridade acrossômica. No estudo atual, os defeitos de acrossoma no corante EN corresponderam a 12% das anormalidades contabilizadas, percentual bastante elevado para a espécie. A morfologia da cabeça do espermatozoide, especialmente a área do acrossoma, está relacionada à capacidade do espermatozoide se ligar à zona pelúcida (CUI *et al.*, 2000). Estudos demonstram que os defeitos acrossômicos prejudicam a função da membrana plasmática, o que, por sua vez, predispõe a capacitação prematura e uma reação acrossômica espontânea (THUNDATHIL *et al.*, 2001; THUNDATHIL *et al.*, 2002). Tendo, portanto, forte influência sobre a fertilidade e demonstrando a importância do estudo

morfológico com um corante que não induza alterações na estrutura espermática, a ponto de indicar que um reprodutor possa estar com a fertilidade comprometida.

Apesar dos corantes PO e AB não diferirem quanto à incidência de Defeitos Maiores, ambos tiveram alta incidência de espermatozoides com Defeitos de Peça Intermediária (8,15 e 7,1%, respectivamente). O Panótico rápido tem sido reconhecido pela maior capacidade de detecção de anormalidades espermáticas (MOTA e RAMALHO-SANTOS, 2006; POZOR *et al.*, 2012). No entanto, os achados do estudo atual sugerem que o Panótico induza a formação de anormalidades e não a sua detecção.

Os valores encontrados para o percentual de anormalidades total, no presente estudo, ultrapassaram o máximo preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) para a espécie caprina (20%). Em outros estudos conduzidos no Nordeste e sob condições similares foram relatados percentuais de anormalidades menores (CATUNDA *et al.*, 2011; AGUIAR *et al.*, 2013), mesmo em época seca. Esses achados negativos podem ser atribuídos à ausência de suplementação durante o período experimental. Estudos anteriores indicam que dietas de baixa qualidade podem suprimir a produção de testosterona (PARKER e THWAITES, 1972), o que pode levar a disfunções epididimárias e, conseqüentemente, ao aumento de anormalidades espermáticas (THERON, 2001; TUFARELLI *et al.*, 2011). Além disso, nos períodos mais quentes do ano, são observados a redução das dimensões testiculares (MOHAMED *et al.*, 2023), a apoptose das células germinativas (ALLAN; HARMON; KERR, 1987), danos ao DNA espermático (MCDONALD *et al.*, 2007), distúrbios na maturação (SETCHEL, 1998) e maior porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais em caprinos (SALLES *et al.*, 2020; ELSHEIKH e ELHAMMALI, 2015).

Dessa forma, os resultados do presente estudo comprovam a hipótese de que corantes alteram a morfologia das células espermáticas de caprinos, sendo o azul de bromofenol a melhor coloração para realização de exames andrológicos de caprinos, pois os esfregaços apresentam-se sempre limpos e sem artefatos que dificultem visualização da célula espermática, independente da temperatura de conservação (MEDEIROS *et al.*, 2006).

## **5 CONCLUSÃO**

Conclui-se que os corantes Azul de Bromofenol, Eosina-nigrosina e Panótico Rápido alteram a morfologia espermática de caprinos, com efeitos mais significativos observados na Eosina-nigrosina.

## REFERÊNCIAS

- ALLAN, D. J.; HARMON, B. V.; KERR, J. F. R. Cell death in spermatogenesis in perspectives on mammalian cell death. **Oxford University Press**, London, p 229-258, 1987. Ed. CS Potten.
- AGUIAR, G.V.; VAN TILBURG, M.F.; CATUNDA, A.G.V.; CELES, C.K.S.; LIMA, I.C.S.; CAMPOS, A.C.N.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, A.A. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 65, n. 1, p. 6-12, 2013.
- AKSOY, E.; AKTAN, T. M.; DUMAN, S.; CUCE, G. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. **Int. J. Morphol.**, v. 30, n. 4, p. 1544-1550, 2012.
- BANASZEWSKA, D.; BANASZEWSKA, D.; ANDRASZEK, K.; ZDROWOWICZ, E.; CZUBASZEK, M.; WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R. The role of staining techniques in seminological analysis of mammalian semen. **Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica**, v. 35, p. 5-20, 2015.
- BASTOS, Y. H. G. B.; FERREIRA, C. S.; GOMES, G. M.; PEIXOTO JÚNIOR, K. C.; GOMES, L. P. M.; PAPA, F. O.; CRESPILOHO, A. M. Avaliação de diferentes técnicas de coloração para esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. **Revista de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 05, 2016. Universidade Severino Sombra.  
<http://dx.doi.org/10.21727/rs.v6i2.48>.
- BLOM, E. The ultra structure of some characteristic's sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: **Atti del VII Simposio Int. Zootecnia**, Milan, pp. 125-139, 1972.
- CAMPBELL, R. C.; DOTT, H. M.; GLOVER, T.D. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. **The Journal of Agricultural Science**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 1956.
- CATUNDA, A.G.V.; AGUIAR, G.V.; LIMA, I.C.S.; PEREIRA, J.F.; PITOMBEIRA, R.S.S.; ANDRADE, I.R.A.; MARTINS, G.A.; SOUZA, C.E.A.; NUNES, J.F.; MOURA, A.A.N.M.; CAMPOS, A.C.N. Characterization of ejaculates from crossbreed male goats raised in tropical environment. **Rev. Port. Ciê. Vet.**, v. 110, n. 577-580, p. 59-67, 2011.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.
- COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. EAST SCHOOL AGRICULTURE SCIENCE UNIVERSITY OF NORTHINGANS, 1983, Norththingans, **Anais**. 1983. p. 453-465.

CUI, Y. H.; ZHAO, R. L.; WANG, Q.; ZHANG, Z.Y. Determination of Sperm Acrosin Activity for Evaluation of Male Fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 2, n. 3, p. 229-232, 2000.

CZUBASZEK, M.; ANDRASZEK, K.; BANASZEWSKA, D.; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R. The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. **PloS one**, v. 14, n. 3, 2019. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0214243>.

GAGO, C.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; YEUNG, F.; TABLADO, L.; COOPER, T. G.; SOLER, C. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. **International Journal Of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 169-176, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1998.00113>.

HERNÁNDEZ-CORREDOR, L; LEÓN-RESTREPO, S.; BUSTAMANTE-CANO J.; BÁEZ-SANDOVAL G.; JARAMILLO, X. Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 9, n. 1, p. 34-38, 2020. DOI: 10.15406/jdvar.2020.09.00275.

HENKEL, R.; SCHREIBER, G.; STURMHOEFEL, A.; HIPLER, U. C.; ZERMANN, D. H.; MENKVELD, R. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. **Fertility And Sterility**, v. 89, n. 2, p. 449-455, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.027>.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 996-1003, 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.039>.

KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N.; JOHNSTON, S. D; ROOT, T. K. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. **Journal Of The American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 4, p. 348-352, 1 jul. 1998. American Animal Hospital Association. <http://dx.doi.org/10.5326/15473317-34-4-348>.

KONDRACKI, S.; WYSOKIŃSKA, A.; KANIA, M.; GÓRSKI, K. Application of two staining methods for sperm morphometric evaluation in domestic pigs. **Journal of veterinary research**, v. 61, n. 3, p. 345-349, 2017. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0045>.

MAREE, L.; DUPLESSIS, S. S.; MENKVELD, R.; HORST, G. van Der. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. **Human Reproduction**, v. 25, n. 6, p. 1369-1382, 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq075>.

MCDONALD, R. M.; SMITH, J. F.; MONTGOMERY, G. W.; FLEMING, J. S.; COX, N. R. Sperm DNA damage after scrotal insulation in rams. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**; 2007: New Zealand Society of Animal Production; 1999.

MEDEIROS, A. A.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A.A. A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIREDO, E. L.; RODRIGUES, L. F. S.; RODRIGUES, L. F. S. Utilização do azul de

bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozoide ovino. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 46, n. 1, p. 287-297, 2006.

MOHAMED, R.; MOHAMED, R.; EL-HAMID, I. A.; MADKOUR, F.; SALLAM, A.; ALI, F.; HUSSEIN, H. Semen quality, testicular characteristic, biochemical profile and histopathology of testes of goats under heat stress conditions. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 69, n. 176, p. 76-87, 1 jan. 2023. Egypt's Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.21608/avmj.2022.173957.1100>.

MOSKA, N.; MURRAY, E.; WAKEFIELD, P.; MATSON, P. The staining pattern of human sperm with Diff Quik: relationship with sperm head morphology and a sperm chromatin structure assay (scsa). **Reproductive Biology**, v. 11, n. 1, p. 55-59, 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1642-431x\(12\)60064-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1642-431x(12)60064-3).

MOTA, P. C.; RAMALHO-SANTOS, J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: diff-quick as a simple optical technique to assess changes in the dna of feline epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1360-1375, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.016>.

NAGY, S. Z.; HÁZAS, G.; PAPP, A. B.; IVÁNCICS, J.; SZÁSZ, F.; SZÁSZ, F.; KOVÁCS, A.; FOOTE, R.H. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. **Theriogenology**, v. 52, n. 7, p. 1153-1159, 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00207-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00207-1).

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869, 2009.

ÖZTÜRKLER, Y.; BARAN, A.; EVECEN, M.; KEMAL A.K.; İLERİ, İ. K. Comparison of Ovine Sperm Comparison of Ovine Spermatozoal Morphological Features After Staining of Fixation and Assessment of Morphological Abnormalities in Dead/Live Spermatozoa. **Turkish Journal Of Veterinary & Animal Sciences**, v. 25, n. 5, p. 675-680, 2000.

PARKER, G. V.; THWAITES, C. J. The effects of undernutrition on libido and semen quality in adult Merino rams. **Australian Journal Of Agricultural Research**, v. 23, n. 1, p. 109, 1972. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ar9720109>.

PEREZ-MARIN, C.C.; JIMENEZ, E.; AGUERA, E. Choice of staining technique affects the morphological assessment of epididymal feline sperm. **Veterinární Medicína**, v. 61, n. 10, p. 560-566, 2016. Czech Academy of Agricultural Sciences. <http://dx.doi.org/10.17221/132/2015-vetmed>.

POZOR, M. A.; ZAMBRANO, G. L.; RUNCAN, E.; MACPHERSON, M. L. Usefulness of dip quick stain in evaluating sperm morphology in stallions. **Proc Annu Conv Am Assoc Eq Pract**, v. 58, p. 506-10. 2012.

ROCHA, V. P.; ARAÚJO, L. R. S.; MIRANDA, L. A. M.; MANO, B.; DA SILVA, Ê. C.; DOS SANTOS, F. C. P. Avaliação morfológica de espermatozoides suínos em uma central de inseminação artificial. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal:RBHSA**, v. 15, n. 2, p. 1-12, 2021.

ELSHEIKH, A. S.; ELHAMMALI N. S. Semen quality of mature crossbred male goats during different seasons. **IOSR J. Agric. Vet. Sci**, v. 8, p. 2319-2372, 2015. <http://dx.doi.org/10.9790/2380-08920105>.

SALLES, M. G. F.; VIANA NETO, A. M.; VIEIRA NETO, M. F.; RODRIGUES, I. C. S.; ROCHA, D. R.; CARNEIRO, P. T. S.; ARAUJO, A. A. Tropical climate induces seasonal changes in the reproductive parameters and hormonal profile of Saanen bucks. **Veterinarski Arhiv**, v. 90, n. 3, p. 235-242, 2020. Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. <http://dx.doi.org/10.24099/vet.arhiv.0567>.

SERAFINI, R; LONGOBARDI, V; SPADETTA, M; NERI, D; ARIOTA, B; GASPARRINI, B; PALO, R di. Trypan Blue/Giemsa Staining to Assess Sperm Membrane Integrity in Salernitano Stallions and its Relationship to Pregnancy Rates. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 41-47, 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12221>.

SETCHELL, B. P. The Parkes Lecture Heat and the testis. **Reproduction**, v. 114, n. 2, p. 179-194, 1 nov. 1998. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1140179>.

SOUSA, P. C.; SANTOS, E. A.; SOUZA, A. L.; LIMA, G. L.; BARROS, F. F.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (Pecari tajacu). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 924-930, 2013.

SUTTIYOTIN, P.; THWAITES, C.J. The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 25, n. 3, p. 209-224, 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(91\)90016-s](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(91)90016-s).

TAPALOAGA, D.; TAPALOAGA, P. Assessment of Some Morphometric Parameters in Ram Sperm Correlated with the Collection Method. **Agriculture And Agricultural Science Procedia**, [S.L.], v. 10, p. 340-345, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.072>.

THERON, O. **The effect of season and nutrition on the reproductive potential and sexual characteristics of Boer goat bucks**. 2001. Tese de Doutorado. University of the Free State.

THUNDATHIL, J.; PALOMINO, J.; BARTH, A.; MAPLETOFT, R.; BARROS, C. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 231-243, set. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00127-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00127-0).

THUNDATHIL, J.; PALASZ, A. T.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 87-102, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00913-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00913-5).

TUFARELLI, V.; LACALANDRA, G. M.; AIUDI, G.; BINETTI, F.; LAUDADIO, V. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. **Tropical Animal Health And Production**, v. 43, n. 2, p. 339-345, 22 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-010-9695-y>.