

DIFERENTES MÉTODOS E TÉCNICAS NA AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA: UMA BREVE REVISÃO

Sildivane Valcácia SILVA¹, André Mariano BATISTA², Zoraide Fernandes COLETO³,
Maria Madalena Pessoa GUERRA^{4*}

RESUMO – A fecundação é um processo que sofre interferência de fatores intrínsecos e extrínsecos, e a utilização de biotécnicas pode tanto aprimorar ou diminuir os índices obtidos a campo. A avaliação da amostra seminal pode contribuir para a maximização dos resultados de prenhez. Entretanto, as práticas desenvolvidas para análise na prática profissional subestimam o potencial fertilizante da célula espermática, sendo necessária a utilização de métodos e técnicas que investiguem com maior confiabilidade a capacidade fertilizante da célula espermática, como a avaliação objetiva da motilidade, técnicas fluorescentes para identificar membranas preservadas e, ainda mais precisas, como a microscopia eletrônica de transmissão. Desta forma, com esta breve revisão objetivou-se discorrer sobre métodos e técnicas que vêm sendo desenvolvidos e utilizados na análise de espermatozoides de animais domésticos.

Termos para indexação: Espermatozóide, fluorescência, análise computadorizada, microscopia eletrônica de transmissão.

DIFFERENT METHODS AND TECHNIQUES IN SPERM EVALUATION: A BRIEF REVIEW

ABSTRACT – Fertilization is a process that is influenced by intrinsic and extrinsic factors, and use of biotechnologies can both enhance and decrease the rates found in the field. Evaluation of semen sample can contribute to maximizing results of pregnancy, however, practices developed for analysis in professional practice fertilizer underestimate the potential of sperm cells, necessitating the use of methods and techniques that more reliably investigate the fertilizing ability of sperm cell, such as objective assessment of motility, fluorescent techniques to identify preserved membranes and even more accurate tests such as transmission electron microscopy. Therefore, this review aims to clarify what methods and techniques have been developed and used in the analysis of spermatozoa of domestic animals.

Index terms: Spermatozoon, fluorescence, computer analysis, transmission electron microscopy.

¹ Doutoranda, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife - PE. CEP: 52171-900; Recife, Pernambuco, Brasil.

² Doutorando, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO

³ Dra Bolsista PNPd, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

⁴ Professora Dra. Associada, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE. E-mail: mpguerra@dmv.ufrpe.br. * **Autor para correspondência.**

INTRODUÇÃO

Fisiologicamente, o objetivo final do espermatozóide é o de empreender sucesso na fertilização do oócito, resultando em uma concepção normal. Para tal, o espermatozóide, após a espermição, deve amadurecer dentro do trato genital masculino, deslocar-se através do trato genital feminino, sofrer capacitação e reação acrossomal, ligar-se e penetrar a zona pelúcida do oócito e finalizar o processo com a fusão dos pró-núcleos masculino e feminino (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Como a fecundação é um processo que sofre interferência de fatores intrínsecos e extrínsecos, os resultados esperados em criações de animais de produção podem não ser alcançados, diminuindo a eficiência reprodutiva dos plantéis. Assim, técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial, utilizando sêmen criopreservado, e a transferência de embriões, foram introduzidas na indústria de produção animal com o objetivo de acelerar a difusão de material genético de animais superiores e minimizar obstáculos na eficiência reprodutiva (LORENZO e CARNEIRO, 2003).

Entretanto, a criopreservação de sêmen nas diversas espécies causa extensivos danos químicos e físicos às membranas espermáticas, atribuídos às alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação (PURDY, 2006) advindas dos processos de congelamento/descongelamento, que resulta em uma conseqüente redução na porcentagem de espermatozóides móveis, na velocidade e na capacidade fertilizante (ISACHENKO et al., 2004).

Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento e a utilização de técnicas de avaliação que permitam atestar a capacidade fertilizante da célula espermática exposta a eventos de redução de temperatura. Objetivou-se com essa breve revisão discorrer sobre métodos e técnicas que vêm sendo desenvolvidos e utilizados na análise de espermatozóides de animais domésticos.

AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

Mocé e Graham (2008) relataram que a avaliação do sêmen, utilizando testes laboratoriais é extremamente importante para a indústria da inseminação artificial, por permitir o fornecimento de produtos de qualidade aos clientes e potencializar a utilização do material biológico. A utilização de diferentes ensaios torna possível estimar a capacidade fertilizante de espermatozóides, da mesma forma que possibilita aprovar e/ou descartar amostras de sêmen de qualidade inferior.

Sabe-se, porém, que nenhum teste isoladamente é capaz de medir a fertilidade de um ejaculado (ARRUDA et al., 2007), necessitando-se avaliar vários aspectos, para que se possa determinar a fertilidade potencial do macho (SIQUEIRA et al., 2007). Segundo Mies Filho (1982), duas classes de caracteres devem ser levadas em consideração na avaliação espermática, além do exame microbiológico: os caracteres físico/químicos e os microscópicos. Na primeira classe, avaliações para determinar o volume, cor, aspecto, odor, pH, osmolaridade e composição química do ejaculado podem ser realizadas. Na segunda, a determinação dos índices relativos à concentração, motilidade, vigor, proporção de espermatozóides vivos e morfologia espermática complementam o estudo necessário a determinação de um material de boa qualidade.

Saacke (1982) determinou que as bases gerais para a mensuração da viabilidade espermática devem estar vinculadas a avaliações de: motilidade, velocidade, penetração do muco cervical, preservação do conteúdo celular (núcleo, enzimas e lipídeos), integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal, habilidade para aglutinação em presença de soro sanguíneo (cabeça a cabeça) e habilidade em passar através de filtros como os de lã de vidro e membrana Sephadex.

MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade espermática é uma esti-

mativa microscópica subjetiva, que consiste na avaliação do porcentual (0-100%) de espermatozoides que apresentem atividade cinética, ou seja, avalia a qualidade e a variação de movimento de células vivas em uma amostra de determinada quantidade de sêmen (HAFEZ e HAFEZ, 2004). O valor da motilidade para o sêmen recém-colhido ou *in natura* deve ser igual ou superior a 70% para todas as espécies domésticas (CBRA, 1998).

Segundo Salviano e Souza (2008), os movimentos dos espermatozoides não obedecem a um padrão único, pois há deslocamentos das células para frente (movimento progressivo), em circunferência (movimento circular) ou, ainda, podem apenas se limitar a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório ou local). Desta forma, o CBRA (1998) estabeleceu que: quando o porcentual de espermatozoides móveis é superior aos de gametas com motilidade progressiva, este parâmetro deve ser expresso separadamente, como motilidade total e motilidade progressiva.

A motilidade progressiva é de grande importância para a viabilidade espermática após o processo de criopreservação e, de acordo com Kumar (2000), este é o parâmetro mais importante para a fertilização, por possibilitar o deslocamento desta célula masculina até o gameta feminino. Entretanto, outros autores não correlacionaram a motilidade espermática com a fertilidade. Siqueira et al. (2007) avaliaram a correlação da motilidade progressiva com a taxa de prenhez em fêmeas bovinas e constataram não haver interferência ou correlação entre estas características.

Estudos desenvolvidos por Borges Júnior et al. (2003), relataram não haver relação da motilidade progressiva com a taxa de gestação em mulheres inseminadas intrauterinamente, considerando a concentração espermática mais importante nos resultados de fertilização do que o movimento espermático. Xu et al. (1998) avaliaram os parâmetros seminais de motilidade, concentração e morfologia na inseminação de fêmeas suínas, observando que a motilidade não

foi significativa para determinar o aumento na taxa de prenhez, enquanto que concentrações espermáticas baixas, diminuíram o tamanho da leitegada, assim como a qualidade morfológica dos espermatozoides conferiram uma maior fertilidade. Verstegen et al. (2002) destacaram que a avaliação subjetiva da motilidade espermática pode determinar variações, de acordo com a experiência do avaliador, ocasionando diferenças nos valores para um mesmo parâmetro.

Diante da necessidade de se estabelecer padrões para a utilização da motilidade como critério importante na avaliação seminal, reduzindo a subjetividade, sistemas automáticos de análise de sêmen foram desenvolvidos, fornecendo maior padronização, precisão, confiabilidade e velocidade na obtenção de resultados nas análises (MATOS et al., 2008). Desta forma, o sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis), desenvolvido em meados dos anos 1980, foi proposto como uma ferramenta que poderia substituir a avaliação subjetiva e aperfeiçoar a rotina laboratorial por apresentar velocidade em fornecer informações mais precisas, relativas à concentração, morfologia e qualidade de movimento das células espermáticas, técnicas que geralmente exigem tempo na execução (MORTIMER, 2000).

O diferencial do sistema CASA é a capacidade de produzir informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, bem como a determinação da posição central de cada cabeça espermática (KATZ e DAVIS, 1987). Mortimer (1990), avaliando sêmen humano e Verstegen et al. (2002), o sêmen de animais, determinaram que o sistema CASA pode analisar os seguintes parâmetros: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em porcentual; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cru-

zado (BCF), expresso em Hertz; amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide (ALH), expresso em micrômetros.

Desde o início da aplicação desta técnica, vários questionamentos vêm sendo formulados, como por exemplo, os diferentes tipos de equipamentos disponíveis, as calibrações efetuadas, as informações oferecidas pelos operadores ao sistema, em função da qualificação técnica destes operadores (VERSTEGEN et al., 2002). O entrave para a maximização do uso desta técnica é o custo na aquisição do equipamento que geralmente é adquirido por clínicas especializadas ou instituições de pesquisa, na sua maioria (AMANN e KATZ, 2004).

A célula espermática apresenta peculiaridades entre as diversas espécies domésticas, variando no tamanho e formato da cabeça, comprimento do espermatozóide e atividade cinética (PESCH e BERGMANN, 2006). Segundo Matos et al. (2008) faz-se necessário fornecer ao programa automático informações específicas para cada tipo de célula, no que se refere às características particulares de cada espé-

cie, para que se verifique eficácia nos resultados. Assim, este seria outro fator limitante na expansão do sistema CASA. Entretanto, por conta do interesse gerado em aprofundar estudos com respeito à fisiologia dos espermatozoides, é crescente a quantidade de publicações utilizando este sistema na área veterinária, desde o ano de 1987 (VERSTEGEN et al., 2002), ressaltando que cada indivíduo pode apresentar diferentes comportamentos cinéticos, assim como ejaculados de um mesmo indivíduo, visto que uma amostra seminal é constituída pela soma de subpopulações espermáticas com diferentes níveis de amadurecimento (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Os parâmetros VCL, VSL e VAP (Figura 1) definem quantitativamente o movimento dos espermatozoides, enquanto que LIN, STR, WOB, ALH e BCF (Tabela 1) definem a qualidade da cinética espermática. Larsen et al. (2000) utilizaram o sistema CASA com o objetivo de prever o potencial de fertilidade de espermatozoides humanos e destacaram a importância dos valores de VCL, VAP, STR e BCF para a fertilidade.

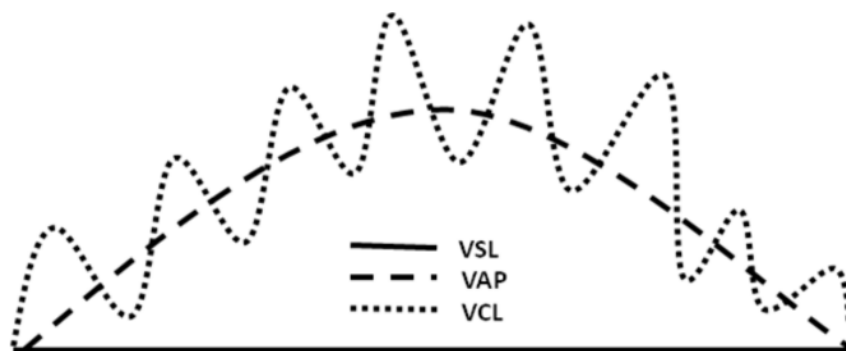


FIGURA 1 – Representação gráfica dos parâmetros quantitativos expressos pelo sistema CASA em uma trajetória irregular. Adaptado de MORTIMER (2000, Figura 9).

TABELA 1 – Relação entre os parâmetros de velocidade qualitativa e proporções das três velocidades

Parâmetros	Proporções das velocidades
Linearidade (LIN)	$(VSL/VCL) \times 100$
Retilinearidade (STR)	$(VSL/VAP) \times 100$
Índice de oscilação (WOB)	$(VAP/VCL) \times 100$

VSL: Velocidade em linha reta; VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média do percurso.
Fonte: adaptado de Mortimer (2000, Página 519).

Em estudo de movimento, Mortimer (2000) determinou que a VCL refere-se ao percurso total que a célula espermática percorre em um determinado período de observação e que é sempre a maior das três velocidades. A VSL, percurso determinado em linha reta do primeiro ao último ponto de observação, geralmente representa a menor das três velocidades. A VAP é a estimativa do percurso médio que o espermatozóide desenvolveu durante o período de observação. Nos casos em que a trajetória da cabeça do espermatozóide é muito regular e linear, com pouco movimento lateral de cabeça, a VAP tem valor semelhante à VSL. Em contrapartida, em trajetórias irregulares, não lineares ou na qual se observa um

alto grau de desvio lateral da cabeça do espermatozóide, a VAP será muito maior em relação à VSL.

Para o estudo da cinética de sêmen ovino, Cavalcante et al. (2008) avaliaram amostras de sêmen *in natura*, obtidas de animais criados nas condições climáticas do Nordeste brasileiro, sendo estes valores expressos na Tabela 2, demonstrando que no primeiro quartil deve constar o valor mínimo para aprovação do ejaculado e no terceiro quartil, o valor máximo para cada parâmetro avaliado. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que o sêmen ovino, na condição *in natura*, apresenta características de movimento curvilíneo, com VAP superior ao VSL, e menor LIN em relação ao STR.

TABELA 2 – Média, desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV), 1º e 3º quartis dos parâmetros cinéticos para sêmen *in natura* de ovinos Santa Inês avaliados em sistema CASA

Estatísticos	Parâmetros cinéticos							
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Média	141,7	97,8	120,3	67,3	79,4	83,0	3,5	7,8
s	43,9	49,3	45,9	23,8	21,0	13,7	1,4	3,0
CV (%)	31,0	50,4	38,2	35,4	26,4	16,5	40,0	39,0
1º quartil	116,7	57,4	91,4	49,7	68,2	76,0	2,6	6,0
3º quartil	172,5	135,0	152,7	88,1	95,9	93,8	4,3	10,0

VSL: Velocidade em linha reta; VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média do percurso. LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação; ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: batimento flagelar cruzado. Fonte: Cavalcante et al. (2008, Tabela 1).

Entretanto, a criopreservação pode ocasionar alterações na célula espermática, que vão interferir na movimentação do espermatozóide. Mortimer e Maxwell (2004) testaram diferentes diluentes para determinar a influência de sua composição na cinética espermática e observaram que o espermatozóide ovino, pós-criopreservação, não apresentava movimentos clássicos como em outras espécies e que, as células espermáticas embora tenham movimentos vigorosos de cauda e menor linearidade, não demonstraram estar hiper-

ativadas, quando avaliadas com a sonda fluorescente Clortetraciclina (CTC).

Mortimer et al. (1998), analisando amostras de sêmen humano, encontraram valores de VCLM150 $\mu\text{m/s}$, LINM 50% e ALHM 7,0 que definiram comportamento cinético compatível com a hiperativação espermática. Gillan et al. (2008) avaliaram sêmen bovino pós-descongelamento e determinaram valores de VCLM 155 $\mu\text{m/s}$, VSLM 100 $\mu\text{m/s}$, LINM 65% e ALHM 5,5 μm , caracterizando o espermatozóide bovino hiperativado. Neste caso, estes valores seriam indese-

gados no momento da avaliação do sêmen pós-descongelamento, uma vez que a hiperativação deveria ocorrer próximo ao local da fertilização e a ativação precoce poderá determinar um menor tempo de vida útil à célula espermática, reduzindo a capacidade fertilizante das amostras.

A temperatura preconizada para a descongelamento de sêmen, independentemente da espécie, é de 37 °C (CBRA, 1998), podendo variar o tempo de exposição a esta temperatura de acordo com o volume da palheta. Entretanto, Chan et al. (1998) observaram que pequenas variações na temperatura do banho-maria, geralmente para maior temperatura (40 °C) no momento da descongelamento, podem hiperativar a célula espermática, não sendo consequência da congelamento, e sim da descongelamento. Desta forma, torna-se primordial reduzir as variações deste parâmetro para que resultados confiáveis sejam alcançados na avaliação *in vitro*. Há necessidade da realização de outros estudos, no sentido de elucidar as diferenças observadas na cinética espermática entre as espécies, e suas modificações, determinando os procedimentos que as originam e sua interferência no momento da fertilização.

INTEGRIDADE DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS

O espermatozóide é formado por diferentes estruturas necessárias ao seu perfeito funcionamento. A célula espermática, quando depositada no trato reprodutor feminino, adquire movimento, sem que isto ateste a condição de viabilidade, podendo apresentar lesões em diferentes compartimentos, como nas membranas plasmática, do acrossoma e das mitocôndrias, em detrimento da cinética apresentada (SILVA et al., 2009b). Para a avaliação da integridade destas estruturas, diferentes métodos e técnicas foram desenvolvidos, visando determinar sua preservação e funções.

Estiraços úmidos de sêmen podem ser examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação em glutaraldeído,

formol-salino ou formol-citrato, com o objetivo de conservar as características celulares e permitir futuras observações, analisando-se 200 células, no mínimo, para uma maior confiabilidade (MIES FILHO, 1982).

Diversos corantes podem ser utilizados, isoladamente ou em associação, para facilitar a visualização de estruturas da célula espermática, e determinar sua condição. Zúccari et al. (2008) determinaram que o corante eosina-nigrosina pode ser utilizado para identificar a preservação e/ou lesão da membrana plasmática, observando que, ao atravessá-la, a célula cora-se de rosa em diferentes pontos e de diferentes maneiras, indicando a condição celular. Ainda neste experimento, o corante trypan blue Giemsa pode ser usado para avaliar o status do acrossoma, sendo seu resultado classificado da seguinte forma: vivos (não corados na região pós-acrossomal e acrossoma rosa); mortos (corados em azul na região pós-acrossomal e acrossoma rosa); reação acrossomal verdadeira (não corados na região pós-acrossomal e ausência de acrossoma); reação acrossomal falsa (corados em azul na região pós-acrossomal e ausência de acrossoma).

Para a avaliação da integridade nuclear, sob imersão em microscopia de campo claro, o corante azul de toluidina pode ser utilizado e seus resultados interpretados de acordo com as variações de cor apresentadas no núcleo, como quando as cabeças estão coradas em azul claro, indicando cromatina íntegra e, as cabeças coradas em azul escuro/violeta ou magenta, indicando falha na condensação da cromatina (ZÚCCARI et al., 2008).

A associação de métodos e técnicas de coloração é uma prática necessária, visto que, alguns corantes são eficientes em sensibilizar determinadas estruturas da célula espermática e ineficientes em outras. Villaverde et al. (2008) utilizaram o método de Karras modificado (KA) e a coloração Fast Green FCF/Rosa Bengala (FR) e, apesar das duas técnicas de coloração permitirem boa visualização das estruturas espermáticas, estes autores observaram menor eficiência

na detecção de defeitos de cabeça nas amstras coradas com KA, assim como menor verificação da presença de gotas citoplasmáticas distais na coloração com FR. Assim, ambas as colorações, usadas isoladamente, não foram totalmente eficientes na identificação dos defeitos de morfologia encontrados na avaliação do sêmen *in natura* de gatos domésticos.

Rodriguez-Martinez et al. (1997) relataram que o desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando sondas fluorescentes para verificação do DNA, de enzimas intracitoplasmáticas, lectinas ou membranas, tem sido apontado como ferramenta auxiliar na determinação da funcionalidade do espermatozóide, após a prática de congelamento-/descongelamento. Celeghini et al. (2007) relataram que, as sondas fluorescentes ou fluoróforos, monitoram a funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas, as quais, possuem a capacidade de ligar-se a pontos específicos das células, permitindo diagnóstico prático e direto. Assim, técnicas de fluorescência têm sido utilizadas com sucesso em diferentes espécies e em diferentes estruturas da célula espermática, podendo ser empregadas de forma isolada ou em asso-

ciações nas espécies bovina (GARNER et al., 1997), equina (GRAVANCE et al., 2000), caprina (BATISTA et al., 2009) e ovina (SILVA et al., 2009b).

Sondas com afinidade por ácido desoxirribonucléico (DNA) são utilizadas na avaliação da integridade da membrana plasmática, pois uma vez lesada esta estrutura, a sonda atravessa-a e cora o núcleo, onde concentra-se o DNA. Silva e Gadella (2006) listaram diferentes sondas utilizadas com esta finalidade: Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de Propídeo (IP), Etídio Homodimérico-1, ToPro-3 e TOTO.

Outra forma de avaliar a integridade da membrana é fazer uso de sondas classificadas como anfipáticas, que conseguem atravessar a membrana intacta e se ligar às esterases, identificando a célula viável, como quando se usa o Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e do SYBR-14® (Figura 2). Segundo Medina et al. (2000), o DCF é um éster não polar, não fluorescente, permeável à membrana plasmática que, dentro da célula é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que o adsorve e fluoresce em verde.

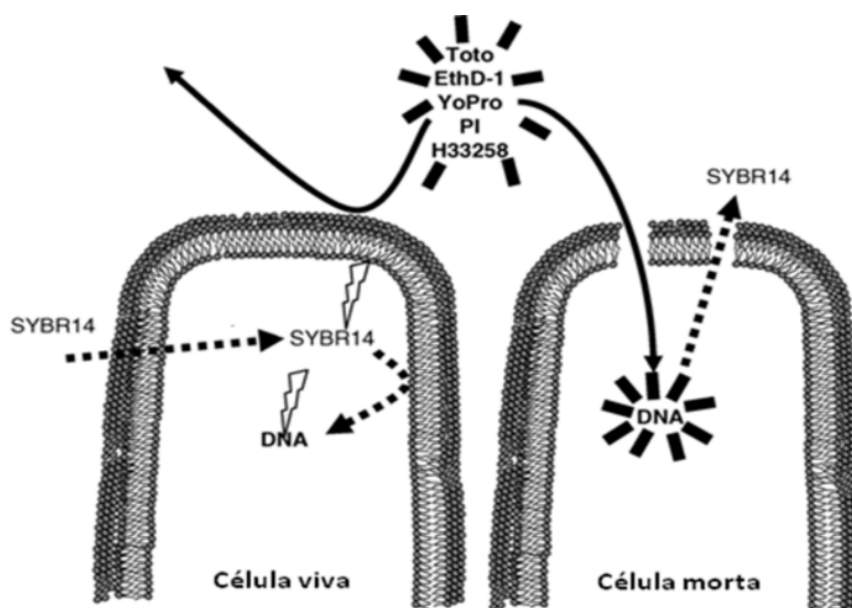


FIGURA 2 – Esquema da ação de diferentes sondas utilizadas em testes de integridade da membrana plasmática.

Fonte: Silva e Gadella (2006, Figura 1).

Geralmente, faz-se a associação destas sondas com outra que tenha afinidade com DNA, como o IP, onde são obtidos resultados confiáveis para identificar a preservação da membrana plasmática de espermatozoides, uma vez que a membrana íntegra cora em verde, pela ligação do DCF às esterases e a lesada cora a região nuclear em vermelho pela ligação do IP ao núcleo celular (COLETO et al., 2002). Peterson et al. (2007), usando uma combinação das sondas fluorescentes SYBR-14® e IP (LIVE/DEAD, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) na avaliação de sêmen de caprinos da raça Saanen, concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18 °C ($r=0,77$) e 4 °C ($r=0,98$), sendo 4 °C a temperatura de conservação espermática indica-

da, por preservar melhor as membranas de espermatozoides caprinos.

Silva e Gadella (2006), em uma revisão sobre a avaliação da integridade do acrossoma, destacaram que as lectinas podem ser utilizadas, uma vez que são capazes de ligar-se a carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal (Figura 3). Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), assim como a Concanavalina A (ConA), uma lectina D-glucose/D-manose ligante extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*, são associadas a fluoróforos, para permitir sua visibilização ao microscópio de imunofluorescência, sendo mais utilizado o Isocianato de Fluoresceína (FITC).

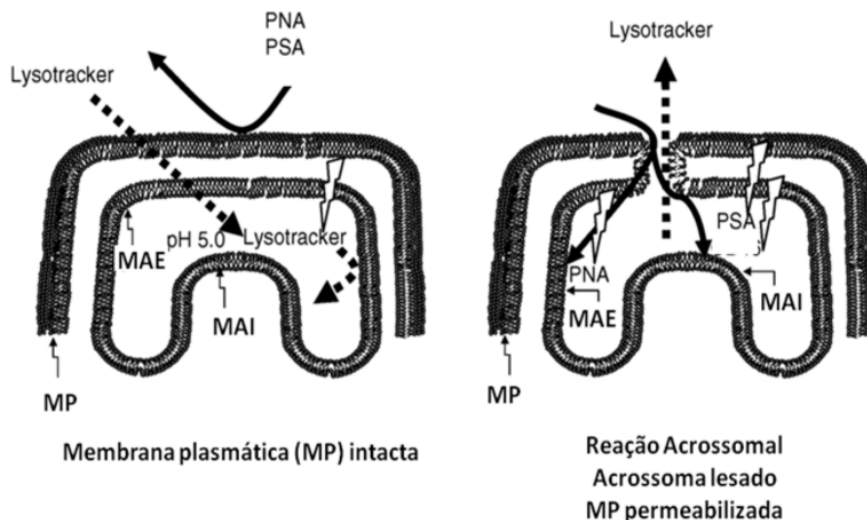


FIGURA 3 – Esquema de ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI).

Fonte: adaptado de Silva e Gadella (2006, Figura 2).

As lectinas possuem diferentes locais de atuação, como a PNA que se liga aos glicoconjugados da membrana acrossomal externa e as PSA e ConA que apresentam afinidade pela membrana acrossomal interna, mais especificamente aos grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (HOLDEN et al., 1990). Desta forma, no caso do uso das PSA e ConA, quando a membrana plasmática está intacta, não há

fluorescência. Entretanto, quando a membrana plasmática está danificada, como nos casos de fixação da célula espermática, observa-se fluorescência na região do acrossoma (SILVA e GADELLA, 2006).

Outra forma de identificar alterações na matriz acrossomal é a utilização de sondas que tenham afinidade por pH ácido, já que o conteúdo acrossomal tem pH próximo a 5 (ABOU-HAILA e TULSIANI, 2000). A

sonda fluorescente LysoTracker Green TM® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tem afinidade por pH ácido contido em organelas, e marca células vivas. Quando o acrossoma está intacto, a sonda penetra a membrana plasmática e concentra-se no interior do acrossoma, evidenciando fluorescência. Se o acrossoma está reagido ou lesado, o interior do mesmo tem seu pH modificado para a neutralidade e a LysoTracker se perde no meio extracelular, sem apresentar fluorescência (SILVA e GADELLA, 2006).

Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática, e Garner et al. (1997) testaram a ação dos fluoróforos Rodamina 123 (R123), JC-1 e MitoTrackerTM (MITO) para avaliar a função mitocondrial da célula espermática de bovinos e identificaram que a sonda JC-1 foi eficaz na classificação do potencial da membrana mitocondrial. As sondas que apresentam afinidade mitocondrial são transportadas nas mitocôndrias com a respiração ativa. Portanto, célula com respiração mitocondrial ativa acumula corante nesta organela (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

As sondas R123 e MITO são transportadas nas mitocôndrias que apresentem respiração ativa e o acúmulo destas substâncias faz com que a peça intermediária fluoresça na coloração verde. Todas as mitocôndrias funcionais coram-se em verde com R123 e MITO, não havendo diferença entre as taxas respiratórias exibidas pelos espermatozoides (SILVA e GADELLA, 2006). Em contrapartida, o JC-1 apresenta diferenças quanto à coloração uma vez que, em concentrações mais baixas, permanece em seu estado monomérico e fluoresce em verde, enquanto em concentrações elevadas, o JC-1 forma agregados que fluorescem na cor laranja. Portanto, o JC-1 não apenas tem a habilidade para distinguir mitocôndria funcional, mas permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam diferenciados pela intensidade da cor apresentada na mitocôndria (GUTHRIE e WELCH, 2006).

AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL

O microscópio eletrônico foi inventado em 1932 por Ernst Ruska (1902-1988) e Max Knoll (1897-1969) e é classificado como um aparelho tecnológico com potencial de aumento muito superior ao de seu congêneres óptico. A microscopia eletrônica é uma importante técnica para determinar o tamanho e a forma de estruturas inorgânicas e biológicas, baseada na interação de elétrons incidentes sobre a matéria. Muitos são os efeitos desta interação e o comprimento de onda do elétron varia entre 0,1 e 1,0 nm. No entanto, não é possível observar material vivo neste tipo de microscópio, pois o material a ser estudado é submetido a um complexo processo de desidratação, fixação e inclusão em resinas especiais, muito duras, que permitem cortes ultrafinos obtidos com ultramicrotomo.

Existem três tipos de microscópio eletrônico: o de transmissão (MET), usado para a observação de cortes ultrafinos; o de varredura (MEV), capaz de produzir imagens de alta ampliação para a observação de superfícies e o de tunelamento, para visualização de átomos (MANNHEIMER, 2002). Por conseguinte, a avaliação da ultraestrutura dos espermatozoides de vertebrados e invertebrados tem sido realizada por meio da MET em galos (BAKST e HOWARTH Jr, 1975), pernilongos (BÁO e SOUZA, 1992) e bovinos (LUQUE e BÁO, 2006), possibilitando caracterizar as estruturas das células espermáticas destas espécies. Hashida et al. (2005) avaliaram espermatozoides de caprinos na condição *in natura*, após a criopreservação e pós-reação acrossomal, identificando diferenças nas estruturas do acrossoma, membrana plasmática e mitocôndrias em células expostas a reduzidas temperaturas. Entretanto, o axonema foi preservado em todas as células avaliadas. Estes autores ainda relacionaram alterações de redução da motilidade espermática à pós-criopreservação do sêmen.

Chirinéa et al. (2006) estudaram a in-

terferência de diferentes diluentes sobre a célula espermática de cães e verificaram que a MET foi utilizada como um teste descritivo e qualitativo, que possibilitou identificar lesões da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação, de difícil visualização em microscopia óptica, como o rompimento da membrana plasmática e a vacuolização das mitocôndrias após a descongelamento das amostras.

Segundo Kasimanickam et al. (2006), alterações na cromatina, como a descondensação, podem interferir negativamente no índice de fertilidade. Espermatozoides com DNA danificado são capazes de fertilizar o ovócito, porém, quando o material genético paterno é requisitado, o desenvolvimento embrionário estaciona (HENKEL et al., 2003). Entretanto, a descondensação não pode ser visualizada em microscópio óptico. Soares e Belletti (2006) avaliaram a ultraestrutura espermática de galos e identificaram que alterações na compactação da cromatina, frequentemente não são acompanhadas por alterações morfológicas, porém as alterações morfológicas,

geralmente são acompanhadas por alterações na compactação da cromatina, que podem ser determinadas pelas diferentes tonalidades de cinza expressas na região nuclear do espermatozoide.

Silva et al. (2009a) avaliaram espermatozoides caninos submetidos ou não à criopreservação através da MET e identificaram que o processo de congelamento/descongelamento afetou diretamente a ultraestrutura das mitocôndrias, com presença de vacuolizações e desorganização, sendo relacionados por estes autores como um processo degenerativo celular ocasionados pelos procedimentos de criopreservação.

Os estudos com a MET, entretanto, têm sido realizados em menor escala, quando comparados às demais técnicas de avaliação espermática, em consequência dos custos operacionais. Pode-se afirmar, entretanto, que embora a MET se apresente como procedimento de difícil acesso, esta técnica é de extrema importância, uma vez que os testes utilizados rotineiramente não permitem avaliar as alterações em proporções subcelulares ou em escala nanométrica (SARAIVA et al., 2009).

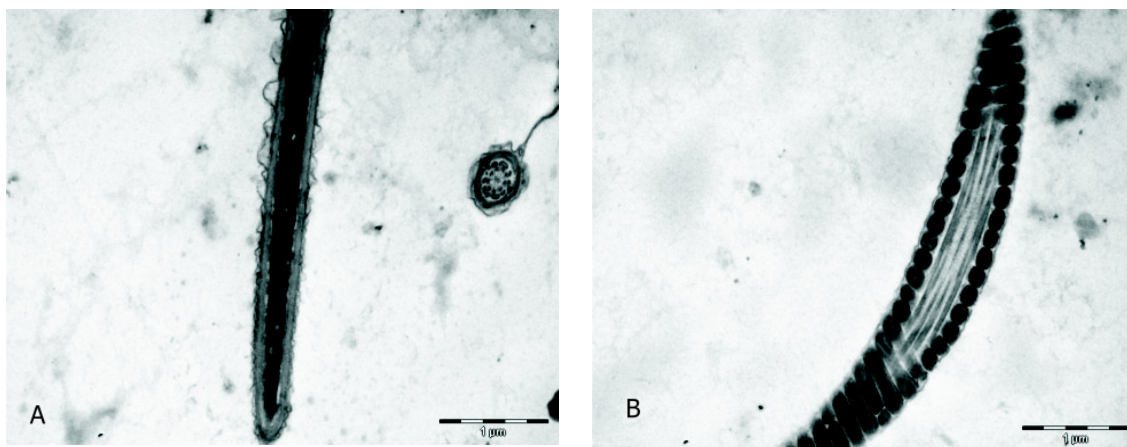


FIGURA 4 – Microscopia eletrônica de sêmen ovino *in natura*. 4A. Espermatozoide ovino, região da cabeça, visualização da membrana plasmática, acrossoma e núcleo. 4B. Peça intermediária de um espermatozoide ovino, visualização das mitocôndrias.

TESTES DE FERTILIDADE

Fertilidade é a capacidade de conceber ou gerar prole. Levando-se em consideração a reprodução assistida, na opinião

de Graham (1996), torna-se difícil conceituá-la, pelo fato de a fertilidade poder resultar de uma única inseminação, de inseminações múltiplas dentro de um único ciclo estral ou de muitas inseminações

durante vários ciclos estrais. Todavia, de acordo com Mocé e Graham (2008), existem diferentes meios para se determinar a fertilidade, que pode ser definida como: a porcentagem de fêmeas inseminadas e os embriões quantificados; fêmeas com prenhez diagnosticada em um determinado período de tempo após a inseminação; fêmeas que não são re-inseminadas em um número definido de dias após a inseminação; fêmeas paridas (para as espécies multíparas, o número de crias deve ser incluído).

Tradicionalmente, o diagnóstico de fertilidade em um macho era feito de acordo com a avaliação descritiva do sêmen, com ênfase no número de espermatozoides presentes no ejaculado, sua motilidade e sua morfologia. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esse conceito é falho e, na realidade, não é o número de espermatozoides móveis ou morfológicamente normais que determina a fertilidade e sim, sua competência funcional (SOARES e GUERRA, 2009).

Estes fatores são ainda mais influenciados quando expostos a condições experimentais, ou seja, quando se utiliza diferentes protocolos para testar o mais indicado para o aumento dos índices de prenhez. Cox et al. (2002) determinaram que a taxa de prenhez é uma característica binomial, influenciada por diversos fatores, e exige um grande número de fêmeas inseminadas para exprimir as diferenças significativas entre os tratamentos estabelecidos em um determinado experimento.

Na espécie suína, as condições ambientais influenciam mais as taxas de concepção do que a prática de monta natural ou IA, uma vez que as médias de temperatura máxima e mínima se correlacionaram negativamente com a taxa de parição (CANDINI et al. 2000). Meneghetti e Vasconcelos (2008) avaliaram a inseminação artificial em bovinos e observaram que a melhor condição corporal influenciou positivamente na taxa de concepção e que animais mais jovens e com menor condição corporal obtiveram menores índices de prenhez.

Por outro lado, Rodríguez-Martínez

(2007) afirmou que técnicas de avaliação laboratorial podem expressar resultados confiáveis quanto ao poder fertilizante da célula espermática. Entretanto, estas avaliações devem ser correlacionadas com os resultados de IA. Amann e Schanbacher (1983) relataram que os programas de IA realizados nas espécies equina, bovina leiteira e suína são mais aprimorados, quando comparados aos praticados na bovino-cultura de corte e caprino-ovino-cultura, devido ao período de tempo decorrido desde que foram desenvolvidos e a frequência com que são realizados, uma vez que nestas últimas os programas de IA são mais escassos e ocasionados pelo manejo destes rebanhos. Vasconcelos e Vieira (2005), no Brasil, e mais especificamente na região Nordeste, relataram que esta afirmação pode ser constatada, justificada pelo fato de a criação de pequenos ruminantes nesta região ser basicamente uma exploração de subsistência, com ausência ou pouca utilização de biotecnologias.

Como alternativa, Cox et al. (2000) afirmaram que é possível avaliar a taxa de fertilização utilizando a técnica de transferência de oócitos homólogos colhidos em abatedouro, promover a IA e, a seguir, colher as estruturas para a análise. Cox et al. (2002) colheram oócitos bovinos em animais de abatedouro, realizaram a transferência para o sistema reprodutor de cabras, promoveram a IA com sêmen caprino e colheram as estruturas, comprovando a fertilização de oócitos heterólogos. Ressalta-se, entretanto, que os oócitos estavam desnudos ao serem transferidos, não sendo requerido o prévio reconhecimento espécie-específico entre espermatozóide-oócito. Desta forma, os autores validaram a técnica como uma alternativa para prever a capacidade fertilizante da célula espermática ou comparar os resultados obtidos previamente *in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O espermatozóide é uma célula altamente especializada, com estruturas e fun-

ções características. Cada estrutura tem sua peculiaridade e moléculas presentes apenas em determinadas regiões, que uma vez lesadas, comprometem a funcionalidade deste gameta influenciando negativamente os índices de fertilidade. Tanto os distúrbios reprodutivos quanto à manipulação destes gametas nos processos de criopreservação podem provocar alterações na qualidade morfofuncional dos espermatozoides, as quais repercutem negativamente na capacidade de fecundação destes gametas.

Técnicas elaboradas para análise da célula espermática constituem grande avanço na busca pelo conhecimento da fisiopatologia dos gametas masculinos submetidos ao processo de criopreservação, através do entendimento da viabilidade espermática pelos estudos específicos de suas estruturas com uso de sondas fluorescentes, do sistema computadorizado de análise da cinética celular, da microscopia eletrônica de transmissão, entre outros métodos.

Os parâmetros avaliados e as técnicas devidamente selecionadas podem auxiliar tanto na seleção de reprodutores que apresentem resistência aos processos de criopreservação quanto na identificação de animais portadores de deficiência reprodutiva e direcionar a seleção de reprodutores capacitados a serem utilizados em programas de melhoramento genético auxiliados pela reprodução assistida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D.R.P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v. 379, n. 2, p. 173-182, 2000.

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, Stanford, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 57, suppl. 2, p. 380-403, 1983.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

BAKST, M.R.; HOWART Jr., B. The head, neck and midpiece of cock spermatozoa examined with the transmission electron microscope. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 12, p. 632-640, 1975.

BÁO, S.N.; SOUZA, W. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the spermatid and spermatozoon of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **BioCell**, Mendoza, v. 75, p. 37-44, 1992.

BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T. et al. Efeito dos métodos Swim-up e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009.

BORGES JÚNIOR, E.; ROSSI, L.M.; ROCHA, C.C. et al. Importância dos parâmetros seminais nos resultados de inseminação intra-uterina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 243-248, 2003.

CANDINI, P.H.; VIANA, C.H.C.; MADUREIRA, E.H. et al. Comparação dos índices reprodutivos com inseminação artificial ou cobertura natural sob influências sazonais em suínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 6, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-9596200000600012&lng=en&nrm=iso>. doi: 10.1590/S1413-9596200000600012.

CAVALCANTE, J.M.M.; MENEZES, E.S.B.; BRASIL, O.O. et al. Parâmetros cinéticos do sêmen fresco de ovinos da raça Santa Inês avaliados em sistema CASA. In: CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35, 2008, Gramado-RS. **Anais...**, Gramado-RS, 2008 (CD-ROM).

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. 49p.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm

- simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 42, p. 479-488, 2007.
- CHAN, P.J.; CORSELLI, J.U.; PATTON, W.C. et al. Enhanced fertility after heat-induced hyperactivation. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 69, n. 1, p. 118-121, 1998.
- CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F. et al. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.
- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v. 24, p. 101-104, 2002.
- COX, J.F.; ZAVALA, A.; RIVAS, C. et al. Pregnancy obtained by in vitro fertilization of oocytes collected by laparoscopy-assisted ovum pick up (OPU) in goats. In: *Proceedings of the XI Congress of Veterinary Medicine*, Santiago, Chile. 2000.
- COX, J.F.; ZAVALA, A.; SARAVIA, F. et al. Fertilization efficiency of in vitro matured oocytes transferred to oviducts of inseminated goats: a model to assess in vivo fertilization performance of goat spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, p. 1-8, 2002.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GILLAN L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, Maryland Heights, v. 103, p. 201-214, 2008.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practices**, Philadelphia v. 12, p. 119-130, 1996.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 492-504, 2005.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p. 1691-1703, 2000.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H. et al. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, Chevy Chase, v. 16, n. 2, p. 119-123, 2005.
- HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; HAJIMOHAMMAD, M. et al. DNA fragmentation and assisted reproduction technology. **Reproductive Biomedicine Online**, Londres, v. 7, p. 477-484, 2003.
- HOLDEN, C.A.; HYNE, R.V.; SATHANANTHAN, A.H. et al. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, Nova York, v. 25, n. 3, p. 247-257, 1990.
- ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V. et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1407-1421, 2006.
- KATZ, D.F.; DAVIS, R.O. Automatic analysis of human sperm motion. **Journal of Andrology**, Stanford, v. 8, n. 3, p. 170-181, 1987.
- KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medicine Journal**, Chennai, v. 24, p. 1-6, 2000.
- LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T.K. et al.

- Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 1562-1567, 2000.
- LORENZO, P.L.; CARNEIRO, G.F. Biotecnologia e as perspectivas de futuro para caprino-ovino cultura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2, 2003. João Pessoa, PB. **Anais...**, João Pessoa, PB: EMEPA, 2003. p. 353-360.
- LUQUE, M.C.A.; BÁO, S.N. Structural and ultrastructural characterization of Zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. **Biocell**, Mendoza, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2006.
- MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos materiais**. Rio de Janeiro: E-papers serviços editoriais LTDA, 2002. 221 p.
- MATOS, D.I.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, L.G. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.
- MEDINA, V. H.; VICENTE, W. R. R.; ESPER, C. R. et al. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após congelamento. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, n. 3, p. 204-209, 2000.
- MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J.L.M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 786-793, 2008.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344 p.
- MILCZWSKI, V.; KOZICKI, L.E. Inseminação artificial ovina com sêmen refrigerado aplicado em diferentes vias. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 1, n. 1-2, p. 83-95, 2000.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Maryland Heights, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MORTIMER, D. Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: KEEL, B.A.; WEBSTER, B.W. **Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 97-133.
- MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, Stanford, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, p. 285-291, 2004.
- MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 2139-2146, 1998.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, Amsterdam, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PETERSON, K.; KAPPEN, M.A.P.M.; URSEM, P.J.F. et al. Microscopy and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 863-871, 2007.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Maryland Heights, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 19, p. 91-101, 2007.
- SAACKE, R.G. Components of semen quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 55, n.2, p. 1-13, 1982.
- SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 159-167, 2008.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I. et al. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of Experimental Pathology**, Londres, v. 90, p. 454-462, 2009.
- SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDO-

- SO, R.C.S. et al. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009a.
- SILVA, P.N.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M. et al. Criopreservação de sêmen ovino em diferentes estações climáticas: interferência da sazonalidade. In: SINCORTE – Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009b. (CD-ROM).
- SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.
- SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 554-560, 2006.
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.
- VASCONCELOS, V.R.; VIEIRA, L.S.A. **Evolução da caprino-ovinocultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br>> Acesso em: 10 de novembro de 2005.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; CORRENTE, J.E. et al. Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrosomal de espermatozoides de gato doméstico (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 3, p. 686-692, 2008.
- XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T. et al. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3079-3089, 1998.
- ZÚCCARI, C.E.S.N.; CARRIJO, P.R.; LEITE, P.A. et al. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 2, p. 358-366, 2008.