



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

YASMIM DANTAS BRAGA

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE OVINOS
UTILIZANDO DIFERENTES CORANTES

FORTALEZA

2023

YASMIM DANTAS BRAGA

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE OVINOS
UTILIZANDO DIFERENTES CORANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a 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)

B796a Braga, Yasmim Dantas.
Avaliação morfométrica de células espermáticas de ovinos utilizando diferentes corantes / Yasmim Dantas Braga. – 2023.
16 f.

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. Corantes. 2. Digitalização. 3. Espermatozoides. 4. Mensuração. I. Título.

CDD 636.08

YASMIM DANTAS BRAGA

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE OVINOS
UTILIZANDO DIFERENTES CORANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Aprovada em: 12/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Nascimento Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Carla Renata Figueiredo Gadelha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Bruno Ramires Macedo Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Programa Nacional de Mestrado (DZ/CCA/UFC)

A Deus e aos Orixás.

Aos meus pais, Marcleide e Braga.

Aos meus irmãos Catarina e Koballsky.

À minha avó Rita Medeiros (*in memoriam*).

Ao meu esposo Evanildo de Lima Júnior.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos meus Orixás, pelo dom da vida e por todas as bênçãos alcançadas e oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais Marcleide Dantas Braga e José da Silva Braga, aos meus irmãos Catarina e Koballsky, e ao meu esposo Evanildo Junior por todo o amor e apoio incondicional, pelos ensinamentos, estímulo aos estudos e de correr atrás dos meus sonhos sempre de forma honesta e íntegra. Obrigado por todos os esforços e dedicação em meio a tantas dificuldades e atribulações. A vocês eu devo tudo.

A minha avó Rita Medeiros (*in memorian*) por sempre ter me incentivado aos estudos e sempre servir como exemplo de mulher íntegra e honrada.

A Prof Ana Cláudia Nascimento por toda orientação desde o início da graduação, onde sempre esteve presente me ensinando, auxiliando em projetos, trabalhos, congressos e puxando minha orelha sempre que preciso ocupando o papel muitas vezes de mãe na minha vida. A senhora devo minha eterna gratidão por todo o companheirismo nessa jornada.

A Prof Carla Renata Gadelha por ter sido uma pessoa incrível nessa jornada, sempre me auxiliando e apoiando tanto do âmbito pessoal como no acadêmico.

À Universidade Federal do Ceará, por todas as oportunidades e aprendizados.

Aos professores do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, por todos os ensinamentos e incentivo durante toda a graduação.

À coordenação do curso de Zootecnia, em nome do coordenador Luciano Pinheiro, e ao secretário José Clécio, por todo o apoio e auxílio.

À minha amiga Raynara Cardonha por todo o companheirismo, incentivo, paciência e amor. Sou grata por sua amizade.

Ao meu amigo Samuel Pinho por todo o aprendizado e companheirismo, suas explicações me salvaram muito antes das provas e sua amizade me acolheu em todos os momentos.

Ao Laboratório de Estudos em Reprodução Animal – LERA e o Setor de Ovinocaprinocultura, que foram de extrema importância no meu crescimento profissional.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.”

(Henry Ford)

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE OVINOS UTILIZANDO DIFERENTES CORANTES

MORPHOMETRIC EVALUATION OF RAM SPERM CELLS USING DIFFERENT DYES

Yasmim Dantas Braga*

RESUMO

Esse estudo avaliou a influência dos diferentes tipos de corantes utilizados no tamanho das células espermáticas de ovinos. Foram utilizados quatro ovinos, que foram submetidos ao manejo intensivo e alimentados conforme especificações do NRC. Os ejaculados foram diluídos em Tris a uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/ml, em seguida, foram confeccionados esfregaços que foram corados com eosina-nigrosina, azul de bromofenol e coloração panótico (Diff Quik) e uma lâmina não foi corada (controle). No total, 2.000 espermatozoides (500 espermatozoides de cada coloração e do controle) foram digitalizados e avaliados pelo ImageJ, software para processamento e análise de imagens. Os espermatozoides foram mensurados quanto ao comprimento da cabeça, largura, perímetro e área de cabeça, comprimento da cauda e comprimento total do esperma em μm . Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS 9.1, submetidos ao estudo da ANOVA. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que os corantes usados nesse estudo aumentaram o tamanho das células espermáticas, com os maiores valores foram verificados no Panótico e os menores no Controle ($P < 0,001$). A exceção foi verificada para o comprimento da cauda, pois o menor valor foi encontrado no corante azul de bromofenol ($P < 0,001$). Outro aspecto constatado, foi que cada corante confere uma dimensão diferente para a célula espermática ($P < 0,001$). Conclui-se que as dimensões morfométricas dos espermatozoides de ovinos foram influenciadas pelos diferentes procedimentos de coloração. Além disso, este é o primeiro relato em que as dimensões de células espermáticas de ovinos são obtidas sem uso de coloração.

Palavras-chave: Corantes, digitalização, espermatozoides, mensuração.

*Graduada em Zootecnia pela UFC – Fortaleza/CE. E-mail para correspondência: yasmimbd@hotmail.com

ABSTRACT

This study evaluated the influence of different types of dyes used on the size of ram sperm cells. Four sheep were used, which were submitted to intensive handling and fed according to NRC specifications. Ejaculates were diluted in Tris at a final concentration of 100×10^6 spermatozoa/ml, then smears were made and stained with eosin-nigrosin, bromophenol blue and panoptic staining (Diff Quik) and one slide was not stained (control). In total, 2,000 spermatozoa (500 spermatozoa of each stain and of the control) were digitized and evaluated by ImageJ, software for image processing and analysis. The spermatozoa were measured in terms of head length, width, perimeter and head area, tail length and total sperm length in μm . The data were analyzed using the SAS 9.1 statistical program, submitted to the ANOVA study. Values were considered statistically significant when $p < 0.05$. The results showed that the dyes used in this study increased the size of sperm cells, with the highest values observed in the Panoptic and the lowest in the Control ($P < 0.001$). The exception was found for tail length, as the lowest value was found in the bromophenol blue dye ($P < 0.001$). Another aspect observed was that each dye confers a different dimension to the sperm cell ($P < 0.001$). It is concluded that the morphometric dimensions of ram spermatozoa were influenced by the different staining procedures. Furthermore, this is the first report in which the dimensions of ram sperm cells are obtained without the use of staining

Keywords: Dyes, digitization, sperm, measurement.

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de predição da qualidade espermática e de sua correlação com a fertilidade precisa ser melhorada. Apesar disso, a avaliação seminal é uma ferramenta importante para a seleção de reprodutores. Os parâmetros mais relevantes para a análise de sêmen são a concentração, vigor e motilidade e morfologia do espermatozoide. Dentre esses parâmetros, a morfologia dos espermatozoides é umas das melhores formas de se obter informação sobre a fertilidade masculina (BANASZEWSKA *et al.*, 2015a), e o exame de morfometria espermática (DE PAZ *et al.*, 2015), que possibilita diagnosticar o quadro de fertilidade, por meio da determinação da regularidade dos espermatozoides, mostrando as possíveis anomalias morfológicas, constitui ferramenta importante. Desse modo, a análise morfométrica é outro método usado para avaliar a morfologia e pode ser usado para determinar defeitos espermáticos que ocorrem principalmente na cabeça, incluindo macro ou microcefalia (MAREE *et al.*, 2010).

Entretanto, no mesmo ejaculado é possível encontrar subpopulações espermáticas que podem apresentar diferentes morfometrias (MAROTO-MORALES *et al.*, 2012; VICENTE-FIEL *et al.*, 2013; VALVERDE *et al.*, 2016) e motilidades (YÁNIZ *et al.*, 2015). Estudos recentes demonstraram que, *in vitro*, ovinos de alta fertilidade apresentaram maior proporção de espermatozoides com motilidade eficiente (rápida e linear) e com cabeças grandes e longas. Sugerindo que essas subpopulações podem apresentar uma maior eficiência migratória de espermatozoides através do trato genital feminino (YÁNIZ *et al.*, 2015). Embora haja evidências de relações entre as características morfométricas dos espermatozoides e a fertilidade, os resultados variam amplamente e às vezes são contraditórios (MAROTO-MORALES *et al.*, 2016). Por isso, conhecer as implicações do tamanho dos espermatozoides sobre a fertilidade pode fornecer uma nova ferramenta para avaliação do sêmen, transformando a morfometria em um teste confiável e preditivo de fertilidade potencial (GARCÍA-VÁZQUEZ *et al.*, 2016).

Um método de avaliação da morfologia e morfometria dos espermatozoides é a análise espermática assistida por computador (CASMA - *Computer Assisted Sperm Morphological Analysis*), que propicia análises com menor subjetividade e menor chance de erro (GAGO *et al.*, 1998; DE PAZ *et al.*, 2015), porém, esse sistema é relativamente caro e não está isento de erros (BANASZEWSKA *et al.*, 2015b). Visto que, é necessário determinar se a avaliação automatizada da morfometria é tão eficaz quanto a avaliação clássica de morfometria (MORRELL, 2022). Devido ao seu alto custo, o uso desse sistema pode ser

inviável para o uso de interessados sem tantos recursos.

A partir da hipótese de que os espermatozoides de ovinos podem apresentar dimensões alteradas após as técnicas de coloração, propõe-se que há necessidade de padronização da avaliação da morfometria espermática dos espermatozoides considerados normais. Este estudo objetivou, portanto, verificar se os corantes rotineiramente utilizados nas análises interferem no tamanho das células espermáticas de ovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento, animais experimentais e processamento do sêmen

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA), do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. Os ejaculados foram obtidos de quatro ovinos deslanados (24 meses de idade e 40 kg de peso corporal), sendo três animais da raça Santa Inês e um da raça Morada Nova variedade branca. Os animais foram previamente treinados e os ejaculados foram avaliados para verificar sua viabilidade para fins experimentais. Os reprodutores foram alojados em baias individuais com comedouros e bebedouros e submetidos ao manejo intensivo. A alimentação foi fornecida na proporção de 60% de volumoso (feno de Tifton 85, *Cynodon dactylum*) e 40% de concentrado, conforme especificações do NRC (2007). A mistura mineral foi adicionada ao concentrado e a água foi fornecida livremente.

Os ejaculados foram obtidos semanalmente com auxílio de uma fêmea em estro natural e de uma vagina artificial. Cada ejaculado foi mensurado quanto ao volume (ml) e a concentração espermática ($\times 10^9$ spz/ml; espectrofotometria). Logo em seguida, o sêmen foi diluído no Tris-citrato (3,63 g de tris, 0,50 g de frutose, 1,9 g de ácido cítrico, 100 ml de água destilada - qsp) de modo a obter uma concentração final de 100×10^6 spz/ml.

Preparação das lâminas

As lâminas foram preparadas para serem coradas por três métodos de coloração: Eosina-nigrosina (EN), Azul de bromofenol (AB) e Panótico (PA); como controle, algumas lâminas não foram coradas.

O corante eosina-nigrosina foi preparado de acordo com o método descrito por Baril *et al.* (1993). O processo de preparação do azul de bromofenol foi realizado conforme descrito por Derivaux (1980), com pH e osmolaridade para as condições fisiológicas dos espermatozoides de pequenos ruminantes (pH 6,8; 300mOsm; 32°C) e estocado a temperatura

ambiente (MEDEIROS *et al.*, 2006). O corante panótico rápido® foi adquirido comercialmente e utilizado conforme a recomendação do fabricante.

No total, 2.000 espermatozoides (500 espermatozoides de cada coloração e do controle) foram digitalizados e avaliados pelo *ImageJ*, que é um software para processamento e análise de imagens, desenvolvido por *Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA*, em linguagem Java. Foram realizadas as seguintes mensurações (μm): comprimento da cabeça, largura, perímetro e área da cabeça, comprimento da cauda e comprimento total do espermatozoide.

Primeiramente, houve a necessidade de obtenção de uma escala real para mensuração dos espermatozoides, o *software* precisa de uma escala conhecida para que possa ser convertida em *pixels* e assim ser usado. Como padrão, utilizou-se as medidas da câmara de *Neubauer*, pois a lateral do quadrado central mede 0,05 mm, equivalente a 50 μm , em *pixels*, e aumento no microscópio óptico de 100 \times . Conhecendo essas medidas foi realizada a confecção da escala usada para a leitura das células. O valor obtido foi 589.1010 *pixels* para a lateral da câmara de *Neubauer* (50 μm), totalizando 11.7820 *pixels* para cada 1 μm .

Para obtenção de medidas mais acuradas foram realizadas medidas preventivas para diminuir possíveis erros. A câmara de *Neubauer* e todas as lâminas foram fotografadas no mesmo dia, no mesmo microscópio, câmara e pelo mesmo operador.

Para medição das células foram usadas as ferramentas disponíveis pelo próprio *Software* e os resultados foram organizados para posterior análise estatística.

Análise Estatística

Os dados obtidos de comprimento, largura e perímetro da cabeça (μm), área do cabeça (μm^2), comprimento da cauda e total do espermatozoide (μm) foram analisados pelo programa estatístico SAS (2009). Então, foram submetidos a ANOVA para verificar o efeito da coloração sobre a morfometria dos espermatozoides. Quando se constatou diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS

Nesse estudo, encontra-se o primeiro relato das dimensões espermáticas de ovinos obtidas a partir de células não coradas que foram previamente digitalizadas e depois

mensuradas no software ImageJ. Então, é possível afirmar que, os valores morfométricos obtidos no Controle correspondem às reais dimensões dos espermatozoides na espécie ovina

Devido a qualidade das imagens e medição do acrossoma e da peça intermediária ficaram comprometidas sendo possível apenas analisar comprimento, largura, área e perímetro de cabeça e tamanho de cauda total (peça intermediária e cauda) e o comprimento total do espermatozoide.

Os resultados da mensuração dos espermatozoides de ovinos não corados e corados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Média \pm erro padrão das medidas morfométricas das células espermáticas de ovinos não coradas (Controle) ou coradas com Eosina-Nigrosina (EN), Azul de Bromofenol (AB) ou Panótico (PA).

Parâmetros	Controle	EN	AB	Panótico	SE (%)	P-valor
Comprimento da cabeça	8,68d	10,49b	10,23c	10,72a	0,024	<0,001
Largura da cabeça	5,34d	5,59b	5,11c	5,83a	0,013	<0,001
Perímetro da cabeça	25,05d	26,91b	26,44c	28,32a	0,054	<0,001
Área da cabeça	42,14d	48,24b	46,04c	53,59a	0,196	<0,001
Comprimento da cauda	64,48c	66,58b	63,17d	70,49a	0,133	<0,001
Comprimento total	73,74c	77,19b	73,46c	81,75a	0,149	<0,001

^{a, b} médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$).

Esses resultados demonstraram que os corantes usados nesse estudo aumentaram o tamanho das células espermáticas, com os maiores valores foram verificados no Panótico e os menores no Controle ($P < 0,001$). A exceção foi verificada para o comprimento da cauda, pois o menor valor foi encontrado no corante azul de bromofenol ($P < 0,001$). Outro aspecto constatado, foi que cada corante confere uma dimensão diferente para a célula espermática ($P < 0,001$).

A observação das células nos diferentes corantes usados nesse experimento, também permitiu constatar que as células espermáticas de ovinos foram eficientemente visualizadas e digitalizadas com os corantes eosina-nigrosina e azul de bromofenol. O panótico coloriu os espermatozoides com menos eficiência, porém as células não coradas tiveram o processo de digitalização e mensuração no ImageJ bem mais difícil.

DISCUSSÃO

Diversos estudos envolvendo a morfometria dos espermatozoides de ovinos foram realizados, enfatizando o comprimento e largura de cabeça (8 - 10 μm e 3,77 – 4,6 μm , respectivamente (EVANS e MAXWELL, 1987), comprimento da peça principal (42,50 μm ; GARCÍA-VÁZQUEZ *et al.*, 2016) e comprimento total do espermatozoide 64,7 μm (GARCÍA-VÁZQUEZ *et al.*, 2016). No entanto, alguns relatos têm indicado a existência de variação nas dimensões da cabeça do espermatozoide entre os indivíduos e épocas do ano (BRAVO *et al.*, 2014; MAROTO-MORALES *et al.*, 2012), fertilidade (YÁNIZ *et al.*, 2015), maturidade sexual (DULAIMI *et al.*, 2015), raça (BARQUERO *et al.*, 2021), métodos de mensuração (DE PAZ *et al.*, 2011) e tipo de corante utilizado (AKSOY *et al.*, 2012). Esses estudos foram importantes para aquisição de conhecimento e estabelecimento dos padrões morfométricos dos espermatozoides normais para a espécie ovina.

É consenso que, um espermatozoide é considerado normal se a forma e o tamanho da cabeça, peça intermediária e cauda estiverem dentro da classificação de uma determinada espécie (CZUBASZEK *et al.*, 2019). No estudo atual, verificou-se que as diferentes técnicas de coloração influenciaram essas dimensões, pois mesmo as células coradas apresentaram valores consideravelmente maiores que as mensurações já citadas anteriormente. Então, é possível inferir que as reais dimensões dos espermatozoides de ovinos são superestimadas quando se usa os corantes eosina-nigrosina, azul de bromofenol e panótico. Este achado pode justificar, em parte, a grande variabilidade de resultados encontrados na literatura internacional. Entretanto, há necessidade de compreensão do porquê dos diferentes corantes promoverem dimensões diversas. Outro aspecto que deve ser considerado é que o aumento do tamanho das células poder ter sido atribuído a uma baixa concentração de colesterol e de ácidos graxos polinsaturados na membrana celular dos espermatozoides dessa espécie (POULOS, DARIN-BENNETT e WHITE, 1973; POULOS *et al.*, 1975; PARKS e HAMMERSTEDT, 1985). Tais características influenciam na fluidez e na suscetibilidade ao dano na membrana espermática (STUBBS e SMITH 1984).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que as dimensões morfométricas dos espermatozoides de ovinos foram influenciadas pelos diferentes procedimentos de coloração. Considera-se importante fazer ajustes nos valores obtidos ou até mesmo na formulação dos corantes afim de evitar

alterações significativas nos valores das dimensões das células. Além disso, este é o primeiro relato em que as dimensões de células espermáticas de ovinos são obtidas sem uso de coloração.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; ANDRASZEK, K.; ZDROWOWICZ, E.; CZUBASZEK, M.; BIESIADA-DRAZGA, B. The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 17-24, 2015.

BANASZEWSKA, D.; ANDRASZEK, K.; ZDROWOWICZ, E.; CZUBASZEK, M.; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R. The role of staining techniques in seminological analysis of mammalian semen. **Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica**, v. 35, 2015.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J-C. Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins. INRA. Nouzilly, 231p, 1993.

BARQUERO, V.; ROLDAN, E. R.; SOLER, C.; YÁNIZ, J. L.; CAMACHO, M.; VALVERDE, A. Predictive capacity of boar sperm morphometry and morphometric sub-populations on reproductive success after artificial insemination. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 920, 2021.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 31, 1992.

BRAVO, J. A.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; ROY, T. J. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. **Small Ruminant Research**, v. 119, n. 1-3, p. 114-119, 2014.

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.

DE PAZ, P.; MATA-CAMPUZANO, M.; TIZADO, E. J.; ÁLVAREZ, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1313-1325, 2011.

DERIVAUX, J. **Reproduction of domestic animals**. Zaragoza, Ed. Acribia, p.446, 1980.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 4. Semen y sus características. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Editorial Acribia, p.25. 1990.

GAGO, C.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; YEUNG, C. H.; 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, 1998

GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; GADEA, J.; MATÁS, C.; HOLT, W. V. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 844, 2016.

MAREE, L.; DU PLESSIS, S. S.; MENKVELD, R.; VAN DER HORST, G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. **Human Reproduction**, v. 25, n. 6, p. 1369-1382, 2010.

MAROTO-MORALES, A.; GARCIA-ALVAREZ, O.; RAMÓN, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J. Current status and potential of morphometric sperm analysis. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 863, 2016.

MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; SOLER, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ROLDAN, E. R.; GARDE, J. J. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: intra-and interindividual variation. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1529-1539, 2012.

MEDEIROS, A. A.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. A. A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIRÊDO, E. L.; RODRIGUES, L. F. S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista**

de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, v. 46, n. 1, p. 287-297, 2006.

MORRELL, J.M. Applied Animal Andrology: Special Procedures. **Manual of Animal Andrology**, p. 56, 2022.

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.

PARKS, J.E.; HAMMERSTEDT, R.H. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

POULOS, A.; BROWN-WOODMAN, P. D.; WHITE, I. G.; COX, R. I. Changes in phospholipids of ram spermatozoa during migration through the epididymis and possible origin of prostaglandin F2alpha in testicular and epididymal fluid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 388, n. 1, p. 12-18, 1975.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative biochemistry and physiology Part B: Comparative biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 541-549, 1973.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 779, n. 1, p. 89-137, 1984.

VALVERDE, A.; ARENÁN, H.; SANCHO, M.; CONTELL, J.; YÁNIZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; SOLER, C. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 6, p. 851, 2016.

YÁNIZ, J. L.; PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SÁNCHEZ-NADAL, J. A.; SANTOLARIA, P J. L. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 128-134, 2015.

YÁNIZ, J. L.; VICENTE-FIEL, S.; CAPISTRÓS, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, S. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1343-1350, 2012.

VICENTE-FIEL, S; PALACIN, I.; SANTOLARIA, P.; & YÁNIZ, J. L. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). **Animal reproduction science**, v. 139, n. 1-4, p. 182-189, 2013.

DULAIMI, M. K. H. A.; TAPALOAGA, D.; TAPALOAGA, P. R.; PETCU, C. D. Results regarding some morphometric features of spermatozoa in ram. **Agriculture and Agricultural Science**

Procedia, v. 6, p. 232-235, 2015.