



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**RAYNARA CARDONHA UCHÔA LIMA**

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS UTILIZANDO  
DIFERENTES CORANTES**

**FORTALEZA**

**2022**

RAYNARA CARDONHA UCHÔA LIMA

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Nascimento Campos.

FORTALEZA

2022

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)

---

L71a Lima, Raynara Cardonha Uchôa.  
Análise morfométrica de espermatozoides caprinos utilizando diferentes corantes / Raynara Cardonha Uchôa Lima. – 2022.  
22 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Zootecnia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos.

1. Corantes. 2. Espermatozóides. 3. ImageJ. 4. Mensuração. I. Título.

CDD 636.08

---

RAYNARA CARDONHA UCHÔA LIMA

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Nascimento Campos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.

Aos meus pais, Nathalia e Alexandre.

A minha avó Helzi, *in memoriam* e avó Aidê.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as graças alcançadas e oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais Nathalia Cardonha e Alexandre Almeida 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. A vocês eu devo tudo.

A minha avó Helzi que esteve presente em toda a minha infância e adolescência, que foi responsável junto com minha mãe pela formação de uma adulta alegre, confiante e saudável, você se foi antes de ver minha colação de grau, mas é com orgulho que lhe digo sua netinha se formou em Zootecnia.

A minha avó Aidê por todo o estímulo aos estudos, a ingressar em uma Universidade Federal, a sempre ser independente e ter força para trabalhar.

Ao meu namorado Gabriel Uchôa que esteve comigo durante o desenvolvimento desse trabalho, que foi peça essencial para o desenvolvimento de uma ferramenta de tabulação automática de dados, que além disso foi uma das minhas bases de conforto e apoio emocional em momentos difíceis. Obrigada por tudo.

As Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Nascimento Campos e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Renata Figueiredo Gadelha, por toda orientação desde o início da graduação, dentro do Programa de Educação Tutorial Pet Zootecnia e do Laboratório de Reprodução Animal onde sempre estiveram presentes me ensinando, auxiliando em projetos, pesquisas, trabalhos, congressos. As senhoras devo minha eterna gratidão por todo o companheirismo nessa jornada.

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, em especial aos professores, Magno José e Pedro Watanabe.

À coordenação do curso de Zootecnia, em nome da coordenadora Andréa Pereira Pinto, e ao secretário José Clécio, por todo o apoio e auxílio.

Ao Laboratório de Reprodução Animal – LERA que foi de suma importância para a realização deste trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura – NEEF, que foi o núcleo onde recebi minha primeira bolsa científica e tive o primeiro contato com pesquisa na área agrária e manejo de pastagens e pequenos ruminantes.

Ao Programa de Educação Tutorial - Pet-Zootecnia, que me permitiu atuar em

atividades de ensino, pesquisa e extensão e foi essencial para o meu desenvolvimento profissional.

A minha amiga Yasmim e ao meu amigo Samuel por todo o companheirismo, incentivo, conselhos, hospitalidade, paciência e gargalhadas. Sou grata por tudo que vocês fizeram e fazem por mim.

Aos meus amigos de infância, Larissa, Jade, Julia, Pedro Ivo e Leonardo pela amizade, amor e carinho de todos. Vocês são pessoas extremamente importantes da minha vida, amo muito vocês, além dos agregados que vieram com eles, João Victor que se tornou muito importante para mim e Mateus (*Zoio*) um grande amigo do ensino médio que por coincidência se apaixonou por uma das minhas melhores amigas do fundamental.

Aos amigos que a Zootecnia me proporcionou, Ana Beatriz, Carol Marques, Bruno, Dayanne, Theyson, Breno e a tantos outros que sempre me ajudaram quando mais precisei, meu muito obrigado a todos.

“Às vezes você precisa lutar pelas coisas que valem a pena a luta.”

(Arriety - “O Mundo Secreto de Arriety”)

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE  
CAPRINOS EM DIFERENTES MÉTODOS DE COLORAÇÃO**

**MORPHOMETRIC EVALUATION OF GOAT SPERM CELLS IN DIFFERENT  
COLORING METHODS**

Raynara Cardonha Uchôa Lima\*

**RESUMO**

Este estudo objetivou verificar se os corantes rotineiramente utilizados nas análises interferem no tamanho das células espermáticas de caprinos. Os ejaculados foram obtidos de três caprinos de 36 meses de idade e 50 kg de peso corporal. Os reprodutores foram alojados em baias individuais com comedouros e bebedouros e submetidos ao manejo intensivo. 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 citrato de sódio, de modo a obter uma concentração final de  $100 \times 10^6$  spz /ml. Por fim, passou por quatro tratamentos, sendo Eosina-nigrosina (EN), Azul de bromofenol (AB) e Panótico (PA); como controle algumas lâminas não foram coradas. No total, 2.000 espermatozoides foram digitalizados e avaliados pelo *ImageJ*, que é um *software* para processamento e análise de imagens. Foram realizadas as seguintes mensurações ( $\mu\text{m}$ ): comprimento, largura, perímetro e área da cabeça, comprimento da cauda e comprimento total do espermatozoide. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (2009), submetidos a ANOVA, onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Através desse estudo é possível inferir que as reais dimensões dos espermatozoides nos caprinos são subestimadas quando se usa os corantes eosina-nigrosina, azul de bromofenol e panótico, visto que esses corantes reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) as dimensões das células espermáticas. Conclui-se que este é o primeiro relato em que as dimensões de células espermáticas de caprinos são obtidas. Os corantes utilizados alteram as dimensões das células espermáticas com os menores valores sendo observados no Panótico.

**Palavras-chave:** Corantes, espermatozoides, *ImageJ*, mensuração

---

\*Graduanda em Zootecnia pela UFC – Fortaleza/CE. E-mail para correspondência:  
raynara.cardonha@gmail.com

## ABSTRACT

This study aimed to verify whether the dyes routinely used in the analyzes interfere with the size of goat sperm cells. Ejaculates were obtained from three 36-month-old goats weighing 50 kg. Breeders were housed in individual stalls with feeders and drinkers and subjected to intensive management. Ejaculates were obtained weekly with the help of a female in natural estrus and an artificial vagina. Each ejaculate was measured for volume (ml) and sperm concentration ( $\times 10^9$  spz/ml; spectrophotometry). Immediately afterwards, the semen was diluted in citrate to obtain a final concentration of  $100 \times 10^6$  spz/ml. Finally, it underwent four treatments, being Eosin-nigrosin (EN), Bromophenol blue (AB) and Panoptic (PA); as a control some slides were not stained. In total, 2,000 sperm were scanned and evaluated by *ImageJ*, which is *software* for image processing and analysis. The following measurements were performed ( $\mu\text{m}$ ): length, width, head circumference and area, tail length and total sperm length. The data were analyzed by the statistical program SAS (2009), submitted to ANOVA, where the means were compared by the Tukey test at 5% of significance. Through this study it is possible to infer that the real dimensions of spermatozoa in goats are underestimated when using eosin-nigrosin, bromophenol blue and panopticon dyes, since these dyes significantly reduced ( $p < 0.001$ ) the dimensions of sperm cells. It is concluded that this is the first report in which the dimensions of goat sperm cells are obtained. The dyes used change the dimensions of the sperm cells with the smallest values being observed in the Panoptic.

## RESUMO

Este estudo objetivou verificar se os corantes rotineiramente utilizados nas análises interferem no tamanho das células espermáticas de caprinos. Os ejaculados foram obtidos de três caprinos de 36 meses de idade e 50 kg de peso corporal. Os reprodutores foram alojados em baias individuais com comedouros e bebedouros e submetidos ao manejo intensivo. 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 citrato de sódio, de modo a obter uma concentração final de  $100 \times 10^6$  spz /ml. Por fim, passou por quatro tratamentos, sendo Eosina-nigrosina (EN), Azul de bromofenol (AB) e Panótico (PA); como controle algumas lâminas não foram coradas. No total, 2.000 espermatozoides foram digitalizados e avaliados pelo *ImageJ*, que é um *software* para processamento e análise de imagens. Foram realizadas as seguintes mensurações ( $\mu\text{m}$ ): comprimento, largura, perímetro e área da cabeça, comprimento da cauda e comprimento total do espermatozoide. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (2009), submetidos a ANOVA, onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Através desse estudo é possível inferir que as reais dimensões dos espermatozoides nos caprinos são subestimadas quando se usa os corantes eosina-nigrosina, azul de bromofenol e panótico, visto que esses corantes reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) as dimensões das células espermáticas. Conclui-se que este é o primeiro relato em que as dimensões de células espermáticas de caprinos são obtidas. Os corantes utilizados alteram as dimensões das células espermáticas com os menores valores sendo observados no Panótico.

**Palavras-chave:** Corantes, espermatozoides, *ImageJ*, mensuração

## ABSTRACT

This study aimed to verify whether the dyes routinely used in the analyzes interfere with the size of goat sperm cells. Ejaculates were obtained from three 36-month-old goats weighing 50 kg. Breeders were housed in individual stalls with feeders and drinkers and subjected to intensive management. Ejaculates were obtained weekly with the help of a female in natural estrus and an artificial vagina. Each ejaculate was measured for volume (ml) and sperm concentration ( $\times 10^9$  sptz/ml; spectrophotometry). Immediately afterwards, the semen was diluted in citrate to obtain a final concentration of  $100 \times 10^6$  sptz/ml. Finally, it underwent four treatments, being Eosin-nigrosin (EN), Bromophenol blue (AB) and Panoptic (PA); as a control some slides were not stained. In total, 2,000 sperm were scanned and evaluated by *ImageJ*, which is *software* for image processing and analysis. The following measurements were performed ( $\mu\text{m}$ ): length, width, head circumference and area, tail length and total sperm length. The data were analyzed by the statistical program SAS (2009), submitted to ANOVA, where the means were compared by the Tukey test at 5% of significance. Through this study it is possible to infer that the real dimensions of spermatozoa in goats are underestimated when using eosin-nigrosin, bromophenol blue and panopticon dyes, since these dyes significantly reduced ( $p < 0.001$ ) the dimensions of sperm cells. It is concluded that this is the first report in which the dimensions of goat sperm cells are obtained. The dyes used change the dimensions of the sperm cells with the smallest values being observed in the Panoptic.

**Keywords:** Dyes, sperm, ImageJ, measurement

## 1 INTRODUÇÃO

As células espermáticas se caracterizam por possuírem uma estrutura morfológica específica, que lhes permite transferir as informações genéticas no processo de fertilização dos ovócitos. Desse modo, pode-se assumir que a capacidade de penetrar no ovócito pode estar relacionada a diferentes características, tais como tamanho (morfometria) e formato (morfologia) dos espermatozoides (GRAVANCE *et al.*, 1999; KONDRACKI *et al.*, 2017; KHATUN *et al.*, 2018). Todavia, a morfologia dos espermatozoides apresenta variações, pois mesmo dentro de uma mesma espécie, e até no mesmo ejaculado, podem ser observadas células de várias formas, tamanhos e aspectos (BANASZEWSKA *et al.*, 2015a). Estas características podem dificultar o diagnóstico de fertilidade (GAGO *et al.*, 1998; KONDRACKI *et al.*, 2017), pois, mesmo fatores externos ao animal, tais como o método de coleta de sêmen (eletroejaculador × vagina artificial) (TAPALOAGA e TAPALOAGA, 2016), bem como o processo de secagem e fixação das células germinativas durante a confecção das lâminas (YÁNIZ *et al.*, 2012) podem contribuir para variações do tamanho da cabeça dos espermatozoides.

Mesmo havendo evidências da relação entre características morfométricas dos espermatozoides e a fertilidade, os resultados possuem amplas interpretações e por vezes resultados contraditórios (MAROTO-MORALES *et al.*, 2016). Estudos realizados por HIDALGO *et al.* (2009) e VICENTE-FIEL *et al.* (2013), utilizando o sistema de análise de morfometria espermática assistida por computador (CASMA), identificaram algumas subpopulações de espermatozoides. Todavia, MAROTO-MORALES *et al.* (2016) relatam que o CASMA possui outras fontes de variação, além do *software* e da análise de dados, que são a preparação da amostra, método de fixação, método de coloração, sistema microscópico (óptica e câmera) e o técnico que o opera.

Inúmeras técnicas de coloração têm sido usadas para avaliar a morfologia espermática dos animais domésticos e humanos (COLAS, 1983; CZUBASZEK *et al.*, 2019; SERAFINI *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2013). Embora os estudos indiquem que as diferentes técnicas de coloração produzam resultados similares, há relatos de diferenças significativas na intensidade da coloração e do contraste e, também sobre o tamanho e a forma dos espermatozoides (BANASZEWSKA *et al.*, 2015b; HIDALGO *et al.*, 2005). Entre os diversos corantes utilizados estão aqueles que são considerados vitais, tais como, a eosina-nigrosina (CAMPBELL *et al.*, 1956; PEREZ-MARIN *et al.*, 2016; SUTTIYOTIN e THWAITES, 1991), azul de tripan (NAGY *et al.*, 1999; SUTTIYOTIN E THWAITES,

1991) e azul de bromofenol (MEDEIROS *et al.*, 2006). Estes corantes possuem a característica de serem simples e de fácil execução. Utiliza-se somente equipamento básico e são extremamente confiáveis. Os mesmos também podem ser utilizados para realizar a avaliação da morfologia espermática (AGUIAR *et al.*, 2013; FRENEAU *et al.*, 2010).

Outro corante que tem sido bastante utilizado na avaliação morfológica de espermatozoides em humanos (MOSKA *et al.*, 2011), primatas (GAGO *et al.*, 1998), bovinos (BASTOS *et al.*, 2015) e ovinos (HERNÁNDEZ-CORREDOR *et al.*, 2020) é o panótico (Diff Quik). No entanto, não há informações se este corante pode afetar a morfometria da célula espermática de caprinos.

Esse estudo tem como hipótese que os espermatozoides de caprinos podem apresentar dimensões alteradas após as técnicas de coloração, que pode justificar a necessidade de uma padronização da avaliação da morfometria espermática dos espermatozoides considerados normais. Sendo assim, objetivou-se verificar se os corantes rotineiramente utilizados nas análises interferem no tamanho das células espermáticas de caprinos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 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 três caprinos (36 meses de idade e 50 kg de peso corporal), das raças Anglo Nubiano e Moxotó. 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 citrato de sódio (2,37 g de citrato de sódio, 0,80 g de glicose e 100 ml de água destilada - qsp) de modo a obter uma concentração final de  $100 \times 10^6$  spz /ml.

### 2.2 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 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 ( $\mu\text{m}$ ): comprimento da

cabeça, largura, perímetro e área, comprimento da cauda e comprimento total do espermatozoide.

Para a utilização do *software* houve a necessidade de obtenção de uma escala real para mensuração dos espermatozoides, pois 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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$ ), totalizando 11.7820 *pixels* para cada 1  $\mu\text{m}$ .

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, câmera e operador.

### **2.3 Análise Estatística**

Os dados obtidos de comprimento, largura e perímetro da cabeça ( $\mu\text{m}$ ), área do cabeça ( $\mu\text{m}^2$ ), comprimento da cauda e total do espermatozoide ( $\mu\text{m}$ ) 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 significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os estudos realizados objetivando mensurar os espermatozoides dos animais domésticos foram conduzidos utilizando pigmentos capazes de colorir essas células. Esses pigmentos compõem os diversos corantes atualmente existentes e têm por finalidade transmitir cor e torná-los mais visíveis e distintos. Então, já foi possível mensurar as células espermáticas de caprinos, de modo que alguns parâmetros, tais como comprimento total do espermatozoide (53,39  $\mu\text{m}$ , GARCÍA-VÁZQUEZ *et al.*, 2016); comprimento e largura de cabeça (6,99 - 8,47 e 3,77 - 4,16  $\mu\text{m}$ , respectivamente; HIDALGO *et al.*, 2006; EVANS e MAXWELL, 1990; MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2006) e comprimento da peça principal (39,75  $\mu\text{m}$ ; GARCÍA-VÁZQUEZ *et al.*, 2016) já foram relatados. Esses estudos foram importantes para o conhecimento e estabelecimento de padrões considerados normais para a espécie caprina. Então, 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).

Nesse experimento, os resultados da mensuração dos espermatozoides de caprinos não corados e corados estão expressos na tabela 1.

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

Parâmetros ( $\mu\text{m}$ )	Controle	EN	AB	PA	SE (%)	P-valor
Comprimento da cabeça	9,94 <sup>a</sup>	9,82 <sup>b</sup>	9,01 <sup>d</sup>	9,24 <sup>c</sup>	0,014	<0,001
Largura da cabeça	5,10 <sup>a</sup>	4,78 <sup>c</sup>	4,83 <sup>b</sup>	4,74 <sup>c</sup>	0,007	<0,001
Perímetro da cabeça	26,28 <sup>b</sup>	26,57 <sup>a</sup>	25,10 <sup>c</sup>	24,05 <sup>d</sup>	0,033	<0,001
Área da cabeça ( $\mu\text{m}^2$ )	45,78 <sup>b</sup>	46,54 <sup>a</sup>	39,45 <sup>c</sup>	37,53 <sup>d</sup>	0,117	<0,001
Comprimento da cauda	58,81 <sup>a</sup>	58,32 <sup>b</sup>	58,24 <sup>b</sup>	57,69 <sup>c</sup>	0,055	<0,001
Comprimento total	68,79 <sup>a</sup>	68,44 <sup>ab</sup>	68,32 <sup>b</sup>	67,36 <sup>c</sup>	0,061	<0,001

<sup>a, b</sup> médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Nesse estudo, encontra-se o primeiro relato de medidas celulares obtidas em células não coradas, digitalizadas e mensuradas no *software ImageJ*. Tais medidas refletem

as verdadeiras dimensões dos espermatozoides de caprinos criados em regiões tropicais. A observação das células nos diferentes corantes usados nesse experimento, também permitiu constatar que as células espermáticas de caprinos foram eficientemente visualizadas e digitalizadas com os corantes eosina-nigrosina e azul de bromofenol. O panótico coloriu com menos eficiência, porém as células não coradas tornaram a visualização bem mais difícil, tornando o processo de digitalização e o processo de mensuração no *ImageJ* bem mais trabalhoso. Devido a qualidade das imagens a medição da peça intermediária ficou comprometida sendo possível apenas analisar o tamanho de cauda total (peça intermediária e cauda) e o comprimento total do espermatozoide

As células coradas, nas atuais condições experimentais, apresentaram dimensões consideravelmente maiores que as medidas já citadas em outros estudos. Entretanto, um estudo conduzido com a mesma espécie e o mesmo *software* (*ImageJ*), encontrou valores similares aos do presente estudo, todavia, os autores evidenciaram que a raça do caprino pode influenciar na morfometria do espermatozoide (WIBOWO *et al.*, 2013). Então, é possível inferir que as reais dimensões dos espermatozoides, nessa espécie, são subestimadas quando se usa os corantes eosina-nigrosina, azul de bromofenol e panótico, visto que esses corantes reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) as dimensões das células espermáticas. As exceções foram constatadas para área e perímetro da cabeça coradas com a eosina-nigrosina, que ocasionou aumento significativo ( $p < 0,001$ ) essas dimensões. Este achado pode justificar, em parte, a grande variabilidade de resultados encontrados na literatura internacional.

Mesmo corantes naturais à base de Cártamo, amora preta e henna promovem alterações no tamanho das células (EBRAHIMI e PARHAM, 2020), que em espermatozoides bovinos promoveram a redução do tamanho da cabeça. HIDALGO *et al.* (2006) constataram que, as medidas morfométricas dos espermatozoides de caprinos foram influenciadas pelo tipo de corante utilizado. De acordo com esses autores, os protocolos de coloração de espermatozoides afetam o tamanho dos espermatozoides por etapas osmóticas e desidratantes. Os achados do presente estudo comprovam a hipótese de que os corantes alteram os tamanhos das células espermáticas de caprinos. Diante do exposto, considera-se importante fazer ajustes nos corantes a fim de evitar alterações significativas nas dimensões das células espermáticas de caprinos.

#### **4 CONCLUSÃO**

Conclui-se que este é o primeiro relato em que as dimensões de células espermáticas de caprinos são obtidas sem uso de coloração. Visto que, os corantes celulares promovem reduções nas dimensões das células de caprinos, induzindo a erros consideráveis.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 6-12, 2013.

ANDRASZEK, K.; BANASZEWSKA, D.; MALGORZATA, S.; WÓJCIK, E.; CZUBASZEK, M.; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R. Use of silver nitrate for the assessment of sperm measurements in selected farm and free-living animal species **Boletim do Instituto Veterinário de Pulawy**, v. 58, n. 3, p. 487-494, 2014.

ANDRASZEK, K.; SMALEC, E. The use of silver nitrate for the identification of spermatozoon structure in selected mammals. **Canadian Journal Animal Science**, v. 91, n. 2, p. 239-246, 2011.

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.

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.

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.

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.

BASTOS, Y. H. G. B.; FERREIRA, C. S.; GOMES, G. M.; PEIXOTO JÚNIOR, K. C.; GOMES, L. P. M.; PAPA, F. O.; CRESPILO, 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. 05-10, 2015.

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.

COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. EAST SCHOOL AGRICULTURE SCIENCE UNIVERSITY OF NORTHINGANS, 1983, Northingans, **Anais...** 1983. p. 453-465.

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.

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

EBRAHIMI, M.; PARHAM, A. Using Herbal dyes as an alternative staining method for sperm evaluation. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 3, p. 441-446, 2020.

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

FRANÇA, L. R.; Becker-Silva, S. C.; Chiarini-Garcia, H. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). **Tissue & Cell**, Siena, v. 31, n. 3, p. 274 – 280, 1999.

FRENEAU, G. E.; RUPP, G.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal reproduction science**, v. 118, n. 2-4, p. 176-181, 2010.

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.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; PITT, C.; VISHWANATH, R.; SAX-GRAVANCE, S. K.; CASEY, P. J. Replicate and technician variation associated with computer aided bull

sperm head morphometry analysis (ASMA). **International journal of andrology**, v. 22, n. 2, p. 77-82, 1999.

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. **J Dairy Vet Anim Res**, v. 9, n. 1, p. 34-38, 2020.

HIDALGO, M.; DORADO, J. Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). **Small ruminant research**, v. 87, n. 1-3, p. 108-110, 2009.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Vet Med-Czech**, v. 50, n. 1, p. 24-32, 2005.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. **Theriogenology**, v. 66, p. 996–1003, 2006.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

KHATUN, A.; RAHMAN, M. S.; PANG, M. G. Clinical assessment of the male fertility. **Obstetrics & gynecology science**, v. 61, n. 2, p. 179-191, 2018.

KONDRACKI, S.; WYSOKINSKA, 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.

MARCO-JIMÉNEZ, M.P.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ, E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by Cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 295–304, 2006.

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.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; ALVAREZ, M.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; GOMES-ALVES, S.; ANEL-LÓPEZ, L.; TIZADO, J. E.; PAZ, P. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1825-1837, 2016.

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.

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.

NAGY, S.; HAZAS, G.; PAPP, A. B.; IVANCSICS, J.; SZASZ, F.; SZASZ JR, F.; KOVÁCS, A. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. **Theriogenology**, v. 52, n. 7, p. 1153-1159, 1999.

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.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.22, n.1, p.87-95, 1991

SERAFINI, R.; LONGOBARDI, V.; SPADETTA, M.; NERI, D.; ARIOTA, B.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R. 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, 2014.

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, n. 7, 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.

TAPALOAGA, D.; TAPALOAGA, P.-R. Assessment of Some Morphometric Parameters in Ram Sperm Correlated with the Collection Method. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 10, p. 340-345, 2016.

VICENTE-FIEL, S.; PALACIN, I.; SANTOLARIA, P.; & YÁÑIZ, 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.

WIBOWO, S. B.; SETIATIN, E. T.; KURNIANTO, E. The Relationship between sperm morphometry and sperm competition in local goats of central Java, Indonesia. **Media Peternakan**, v. 36, n. 3, p. 179-179, 2013.

YÁÑIZ, 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.