

Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade

Evaluation of bull semen parameters and correlation to fertility

Rosiara Rosária Dias Maziero^{1,2}, André Maciel Crespilho¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, José Antônio Dell'Aqua Junior¹, Frederico Ozanan Papa¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu; ²Sexing Technologies.
E-mail: rosiamaziero@yahoo.com.br; papa@fmvz.unesp.br

Resumo

Parâmetros convencionais utilizados para a avaliação espermática têm se mostrado limitados quanto a capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz devido ao fato que cada espermatozóide apresenta múltiplos compartimentos com diferentes funções a serem avaliadas. Dentre os principais testes de análise espermática utilizados pode-se destacar: análise subjetiva da motilidade, análise computadorizada do movimento espermático e morfologia, testes de separação, análise morfofuncional por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Embora nenhuma técnica de avaliação tomada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen bovino.

Palavras-chave: Sêmen, análise laboratorial, fertilidade, bovino

Abstract

Conventional parameters utilized for semen evaluation have proved to be limited in order to predict the sperm potential fertility. A single test is not effective due the fact of each sperm cell presents multiple parts performing different functions. Among the most important sperm analysis tests we can highlight: subjective motility, computerized motility and morphology analysis, separation tests, morpho-functional analysis through fluorescence microscopy or flow cytometry. Although none of the techniques alone present a high efficiency to predict fertility, their combination may present a more accurate scenery for the estimated fertilization potential from bovine semen samples. The objective of this review is to describe methods of laboratory analysis of bovine semen.

Keywords: bull, semen, evaluation, fertility

Introdução

A avaliação do potencial de fertilidade de uma amostra de sêmen é de grande importância para o emprego de biotécnicas de reprodução como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (García-Álvarez, 2009). Entretanto, o alto custo e o consumo de tempo das avaliações, aliado a complexidade e dependência da estabilidade laboratorial imposta pela fertilização *in vitro* (FIV), tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina de análise do sêmen bovino (Hallp *et al.*, 2005; Rodríguez-Martínez, 2005).

Assim, os métodos utilizados em centrais de colheita e processamento de sêmen consistem basicamente da análise subjetiva da motilidade (antes e após estresse térmico), concentração, morfologia e integridade de membranas plasmática e acrossomal (Papa *et al.*, 2008).

Mais recentemente, os principais trabalhos descrevem a adoção de técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático, testes de incubação e separação espermática e análise morfofuncional por sondas fluorescentes para o acesso ao potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado (Crespilho, 2007; Rodríguez-Martínez, 2007; Rodríguez-Martínez e Barth, 2007; Walthers *et al.*, 2004).

Deste modo, esta revisão tem como objetivo descrever os principais métodos de avaliação laboratorial do sêmen bovino.

Morfologia espermática

A análise da morfologia espermática permite a eliminação de touros com baixo potencial de fertilidade, evitando a entrada desses animais nos programas de congelamento de sêmen e nos testes de progênie (Januskauskas e Zilinskas, 2002), pois sabe-se que os defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e infertilidade masculina (Saake *et al.*, 1998, Pesh e Bergmann, 2006).

Nos estudos realizados por Phillips *et al.*, (2004) das 30 análises laboratoriais conduzidas na tentativa de predizer os índices de fertilidade do sêmen bovino congelado, isoladamente apenas morfologia espermática pós-descongelamento apresentou correlação significativa com a taxa de concepção pós-IA. No mesmo trabalho foi possível concluir que as melhores equações preditivas encontradas foram derivadas dos resultados referentes à morfologia espermática, permitindo, dessa forma, a identificação dos touros com maior ou menor potencial de fertilidade.

Apesar da grande importância no contexto da avaliação das amostras seminais, os resultados da análise de morfologia espermática não apresentam uma alta sensibilidade para o acesso a fertilidade do sêmen bovino congelado por ser um método de avaliação subjetiva realizada por meio de microscopia óptica convencional (Arruda, 2004).

Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica (nm) podem ocorrer falhas nos métodos tradicionais de avaliação (Joshi *et al.*, 2001). Por exemplo, embora a identificação de espermatozoides portadores de defeitos de cabeça seja possível através de microscopia de interferência e diferencial (DIC; Saacke *et al.*, 1998), a observação de elementos como o formato da cabeça do espermatozoide requerem o emprego de métodos mais objetivos como a análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA), técnica que pode proporcionar a identificação de touros com problemas de fertilidade (Parrish e Foote, 1987).

Análise computadorizada do movimento espermático

Uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização é a avaliação do movimento espermático de uma amostra, relatando-se uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (Olds-Clarke, 1996). Em termos práticos, a motilidade dos espermatozoides é estimada de forma subjetiva pela avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional, representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de IA (Arruda *et al.*, 2005, Crespilho *et al.*, 2006).

Para se obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade, o sistema computadorizado de análise espermática (CASA) representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células (Ferreira *et al.*, 1997, Januskauskas e Zilinskas, 2002), o que permite a identificação de diferentes subpopulações espermáticas em uma amostra (Vertegen *et al.*, 2002).

No entanto, avaliação computadorizada do movimento espermático proporciona inconsistente correlação com os índices de concepção animal quando utilizada isoladamente, visto que a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozoides concluam com êxito sua função biológica representada pela fertilização do ovócito (Graham e Mocé, 2005).

Testes de separação espermática

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfolologicamente normais (Vertegen *et al.*, 2002) o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro* (Samardzija *et al.*, 2006).

Assim, dentre os principais métodos utilizados para separação espermática destacam-se o *swim-up*, separação por gradiente descontínuo de BSA, filtração em coluna de lã de vidro, técnica do sedimento, filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica, separação por gradiente descontínuo de Percoll e lavagem mediante centrifugação (Coelho *et al.*, 2000). Entretanto, os métodos de separação baseados em lavagens e centrifugações podem resultar em danos irreversíveis aos espermatozoides (Centola *et al.*, 1998), deste modo, existe a preferência por técnicas de separação baseadas na própria capacidade de migração espermática para efeito de avaliação da qualidade das amostras seminais.

Avaliação morfofuncional

Integridade de membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática (IMP) é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (Papa, *et al.*, 2000). A avaliação das membranas espermáticas é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que são extremamente sensíveis as crio-injúrias e dessa forma, responsáveis por uma queda na viabilidade espermática (Yoshida, 2000).

Para a avaliação da IMP têm sido empregado vários testes, como as colorações supra-vitais incluindo Tripán-Blue-Giensa e Eosina-Nigrosina, testes hiposmóticos e mais recentemente o uso das sondas fluorescentes que atuam por reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (Brito *et al.* 2003, Arruda, *et al.*, 2004, Tartaglione e Ritta, 2004; Rodriguez-Martínez, 2005). As preparações empregando a

combinação de sondas fluorescentes ou fluorocromos, avaliadas por microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da IMP dos espermatozoides, gerando dados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas, conferindo especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais (Rodríguez-Martínez, 2003). As principais sondas utilizadas para determinação da viabilidade espermática são o iodeto de propídeo (PI), SYBR-14, Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA), Hoeschst 33258 (H258) e 33342 (H342), e a Concanavalina A (Conc A) associada ao isotiocionato de fluoresceína (Arruda *et al.*, 2005; Graham e Mocé, 2005).

Índice de apoptose

A apoptose celular é um processo de morte celular programada, na qual envolve mecanismos bioquímicos e fisiológicos. Em mamíferos, os estudos conduzidos com sêmen demonstram que os espermatozoides apresentam certas características apoptóticas semelhantes as das células somáticas como a fragmentação de DNA ou a translocação de fosfatidilserina (Gorczyca *et al.*, 1993; Anzar *et al.*, 2002; Brum *et al.*, 2008). Durante o início da apoptose a célula perde sua simetria de membrana plasmática. A fosfatidilserina, normalmente presente no interior da membrana das células saudáveis, é translocada e exposta ao meio extracelular, este distúrbio progressivamente pode levar às lesões de membrana (Martin *et al.*, 1995). Anzar *et al.* (2002), utilizando a associação de anexina V-FITC e iodeto de propídio encontraram quatro diferentes populações espermáticas no sêmen de bovino: necróticas, semi-necróticas, apoptóticas e vivas. A anexina V permite a identificação de células com integridade de membrana numa fase inicial de deterioração em relação a utilização de uma sonda supra-vital (Vermes *et al.*, 1995).

Integridade de membrana acrossomal

O acrossomo é derivado do complexo de Golgi e a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida provoca a reação acrossômica resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais. Estes eventos em conjunto com a hiperativação da motilidade ajudarão o espermatozoide a penetrar a zona pelúcida (HONDA *et al.*, 2002). Assim o acrossomo deve permanecer intacto antes e durante trânsito pelo trato reprodutivo da fêmea até ocorrer à ligação com a zona pelúcida. Quando a reação acrossômica ocorre prematuramente pode-se observar uma queda na fertilidade do sêmen (Silva e Gadella, 2006).

O uso de corantes fluorescentes como Merocianina-540 ou Clortetraciclina têm sido utilizados no sentido de monitorar o grau de capacitação espermática e sua associação com a fertilidade do sêmen bovino congelado (Graham e Mocé, 2005).

A determinação da integridade do acrossomo pode ser realizada pela combinação de sondas fluorescentes como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) associado a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA) que apresentam capacidade de ligação a glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (Arruda *et al.*, 2005), permitindo, dessa forma, a visualização das estruturas sob microscopia de epifluorescência. Já a indução de reação do acrossomo pode ser avaliada *in vitro* pela incubação com glicosaminoglicanos, cálcio ionóforo (Hoescht A23187) ou solubilizado de proteínas de zona pelúcida (Gil *et al.*, 2000; Rodríguez-Martínez, 2000), sendo descritas correlações significativas ($r=0.60$) entre a responsividade à reação e as taxas de não retorno ao cio animal (Januskauskas *et al.*, 2000).

Estrutura da cromatina

A formação do espermatozoide consiste em um processo único envolvendo uma série de mudanças meióticas e mitóticas das espermatogônias. A substituição das histonas com a transcrição de proteínas e adição final de protaminas leva a uma cromatina organizada e acondicionada de maneira singular. O DNA espermático, que ocupa praticamente todo o núcleo, é organizado de forma específica mantendo a cromatina no núcleo compacta e estável (D'Occhio, *et al.*, 2007). Nos estudos em humanos e eqüinos observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (Morrell *et al.*, 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (Madrid-Bury *et al.*, 2005).

Para a análise estrutural da cromatina espermática, a célula deve permanecer em um ambiente ácido e a fim de se verificar a susceptibilidade do DNA à desnaturação, como por exemplo o uso da acridina laranja. O corante se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta se apresenta íntegra. Todavia quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra (Love, 2005).

Avaliação da função mitocondrial

As mitocôndrias encontram-se dispostas helicoidalmente à peça intermediária de cada espermatozoide, apresentando como função principal a produção do ATP celular, matriz energética para os batimentos flagelares.

Em virtude do seu papel biológico, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade (Rodríguez-Martínez, 2005) e na viabilidade dos espermatozoides (Januskauskas E Zilinskas, 2002), embora a correlação com fertilidade *in vivo* apresente-se variável (Hallap, 2005).

Atualmente a função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência por sondas como Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e Mito Tracker Red que permitem a identificação de mitocôndrias em células vivas (Arruda *et al.*, 2005). Outra possibilidade corresponde a utilização da sonda 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) que permite a distinção entre espermatozoides com baixa e alta função mitocondrial (Gadela e Harrison, 2002). JC-1 é uma sonda fluorescente carbocianina lipofílica catiônica que é internalizada pelo funcionamento das mitocôndrias. Quando em baixa função mitocondrial (baixo potencial de membrana mitocondrial) fluoresce em verde. Quando em alta função mitocondrial a concentração de JC-1 dentro das mitocôndrias aumenta e a coloração forma agregados que fluorescem em laranja (Gillian *et al.*, 2005).

Avaliação por citometria de fluxo

A citometria de fluxo possibilita a contagem, classificação e isolamento da célula espermática que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são individualmente movidas por de um sistema detector óptico em fluxo laminar e então contadas. Desse modo, pode-se diminuir a subjetividade e aumentar a repetibilidade para uma maior precisão nas análises de sêmen. Assim, uma série de características da célula espermática como integridade das membranas plasmática e acrossomal, viabilidade e a função celular podem ser avaliadas (Gillian *et al.*, 2005).

Com o citômetro de fluxo é possível a avaliar múltiplos parâmetros em uma única amostra. A associação de sondas fluorescentes depende do tipo de laser, dos detectores de radiação e dos filtros presentes no citômetro. Existem citômetros que possuem até 16 detectores de radiação dispersa e fluorescente, o que permite analisar múltiplas características celulares (Januskauskas *et al.*, 2003; Mocé e Graham, 2008). Novas técnicas de associação de sondas fluorescentes são constantemente sendo desenvolvidas para aplicação na citometria de fluxo para avaliação dos espermatozoides das mais diferentes espécies animais. (Gillian *et al.*, 2005).

Considerações finais

Como os espermatozoides representam células complexas que dependem da funcionalidade de múltiplos atributos para exercerem seu papel natural na reprodução, ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, observando-se, geralmente, correlações baixas ou variáveis entre os padrões de qualidade das amostras seminais avaliadas laboratorialmente e os índices de fertilidade alcançados nos programas de IA em bovinos.

O maior entendimento da qualidade espermática em amostras seminais é fundamental para que em um futuro próximo as avaliações *in vitro* possam projetar de forma segura expectativas de fertilidade com sua aplicação em testes a campo.

Referências

- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TK, Pauls KP.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, v.66, p.354-360, 2002.
- Arruda RP.** Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina. *Anais...* Londrina: [s.n.], 2004. p.166-179.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Souza LWO, Nascimento J, Andrade AFC, Raphael CF, Garcia AR.** Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. *Acta Sci Vet*, v.33, supl. 1, p.145-150, 2005.
- Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP.** Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, p.1539-1551, 2003.
- Brum AM, Sabeur K, Ball BA.** Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, v. 69, p. 1041-1055, 2008.
- Centola GM, Herko R, Andolina E.** Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril*, v.70, p.1173-1175, 1998.
- Coelho LA, Esper CR, Garcia JM.** Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. *Rev Bras Zootec*, v.29, p.397-402, 2000.
- Crespilho AM.** Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF). 2007. 124f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

- Crespilho AM, Landim-Alvarenga FC, Papa FO.** Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. *Ciênc Rural*, v.36, p.1507-1510, 2006.
- D'Occhio MJ, Hengstberger KJ, Johnston SD.** Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim Reprod Sci*, v.101, p.1-17, 2007.
- Ferreira JCP, Neves Neto JR, Papa FO.** Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.131-132, 1997
- Gadella BM, Harrison RAP.** Capacitation induces cyclic adenosine 30,50-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod*, v.67, p.340-350, 2002.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Esteso MC, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ.** Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.71, p.643-650, 2009.
- Gil J, Januskauskas A, Håard MCH, Håard MGM, Johannisson A, Söderquist L, Rodríguez-Mártinez H.** Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. *Reprod Domest Anim*, v.35, p.69-77, 2000.
- Gillian L, Evans G, Maxwell WMC.** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.
- Gorczya W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z.** Presence of DNA strand breaks and increase sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, v.207, p.202-205, 1993.
- Graham JK, Mocé E.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- Hallap T, Nagy S, Haard M, Jaakma U, Johannisson A, Rodríguez-Martinez H.** Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology*, v.63, p.1752-1763, 2005.
- Honda A, Siruntawineti J, Baba T.** Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update*, v.8, p.405-12, 2002.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Haard MGM, Haard MCh, Johannisson A, Rodríguez-Martinez H.** Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v.52, p.641-658, 2000.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodríguez-Martinez H.** Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- Januskauskas A, Zilinskas H.** Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. *Vet Zootech*, v.39, p.1-8, 2002.
- Joshi N, Medina H, Cruz I, Osuna J.** Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. *Fertil Steril*, v.75, p.961-66, 2001.
- Love CC.** The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez J.P, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Sanjuanbenito BP, Gutiérrez-Adán A, Martínez JF.** Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.232-241, 2005.
- Martin, S.J, Reutelingsperger, C.P, Mcgahon, A.J, Rader, J.A, Van Schie, R.C, Laface, D.M, Green, D.R.** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, v.182, p.1545-1556, 1995
- Morrel JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodríguez-Martinez H.** Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, 2008. doi: 10.1186/1751-0147-50-2.
- Olds-Clarke P.** How does poor motility alter sperm fertilizing ability? *J Androl*, v.17, p.183-186, 1996.
- Papa FO, Crespilho AM, Freitas Dell'Aqua CP, Dell'Aqua Jr JA.** Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada, 3, 2008, Londrina. *Anais...* Londrina: [s.n.], 2008. p.78-94.
- Papa FO, Gabaldi SH, Wolf A.** Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. *Rev Bras Reprod Anim*, v.24, p.39-44, 2000.
- Parrish JJ, Foote RH.** Quantification of bovine sperm separation by swim-up method – relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J Androl*, v.8, p.259-266, 1987.
- Pesh S, Bergmann M.** Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v.37, p.597-612, 2006.
- Phillips NJ, Mcgowan MR, Johnston SD, Mayer DG.** Relationship between thirty post-thaw spermatozoa characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.47-61, 2004a.

- Rodriguez-Martínez H.** Evaluation of frozen-semen: tradicional and new approaches. *In: Chenoweth PJ.* Topics in bull fertility. International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: www.ivis.org.
- Rodriguez-Martínez, H.** Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*, v.38, p.312-18, 2003.
- Rodríguez-Martínez H.** Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia. *Anais ... Goiânia: Goiás*, 2005. p.1-8. (CD-ROM)
- Rodriguez-Martínez H.** State of art in farm sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.91-101, 2007.
- Rodriguez-Martínez H, Barth AD.** In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *In: Reproduction in domestic animals*, Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2007. v.6, p.39-54.
- Saacke RG, Dejarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS.** Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulation cattle. *Theriogenology*, v.50, p.117-128, 1998.
- Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J, Karadjole T.** A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.237-247, 2006.
- Silva PFN, Gadella BM.** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-78, 2006.
- Tartaglione CM, Ritta MN.** Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.62, p.1245-1252, 2004.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM.** A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin. *Vet J Immunol Meth*, v.180, p.39-52 1995
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC.** Sperm Morphology and preparation method affect bovine embryonic development. *J Androl*, v.25, p.554-563, 2004.
- Yoshida M.** Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.349-355, 2000.
-