



Técnicas de análise de sêmen

Techniques in semen analysis

T.G. Bergstein^{1,3}, R.R. Weiss¹, S.D. Bicudo²

¹Programa de Pós graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Correspondência: tacia@onda.com.br

Resumo

A análise de sêmen *in vitro* é importante para evitar prejuízos em programas de inseminação artificial e auxiliar o técnico na escolha de reprodutores para estações de monta. Ainda que as técnicas mais avançadas de avaliação de sêmen ovino estejam restritas a centros de pesquisa, avanços nessa área aumentam a acurácia e a repetibilidade das análises. Foram desenvolvidas tecnologias objetivas de avaliação do sêmen que utilizam sistemas computadorizados e *softwares* específicos para examinar imagens dos espermatozoides. A análise de motilidade assistida por computador utiliza fotografias sequenciais em que é possível desenhar o trajeto das células espermáticas. Essa tecnologia tem sido aplicada na pesquisa de novos diluidores e crioprotetores seminais. A morfometria computadorizada diminui a subjetividade da tradicional análise de morfologia espermática realizada manualmente. A aplicação de sondas fluorescentes com leitura em microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo permite a avaliação estrutural e funcional dos espermatozoides de forma mais ampla, criteriosa e rápida. A pesquisa da capacidade de degradação das espécies reativas de oxigênio auxilia na preservação do sêmen tanto congelado quanto descongelado, e vem sendo utilizada na melhoria de meios para criopreservação. Os testes biológicos, ainda que onerosos na pesquisa em ovinos, geram informações importantes sobre a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino e sua capacidade fecundante.

Palavras-chave: análise objetiva, sêmen ovino, sondas fluorescentes, técnicas avançadas.

Abstract

In vitro semen analysis is important to prevent errors in artificial insemination programs and assist the technician in choosing rams for breeding seasons. While the most advanced assessment techniques ram semen are restricted to research centers, advances in this area increase the accuracy and repeatability of analyzes. Objective semen evaluation technologies using specific computer systems and software to examine images of sperm were developed. The analysis of computer-assisted motility uses sequential shots that can draw the path of the sperm cells, this technology has been applied in search of new extenders and seminal cryoprotectants. The computerized morphometry reduces the subjectivity of traditional sperm morphology analysis performed manually. The use of fluorescent probes reading fluorescence microscopy or flow cytometry allows structural and functional assessment of sperm in a more extensive and faster analysis. The research capacity of degradation of reactive oxygen species assists in the preservation of frozen and thawed semen, and has been used in improving the means for cryopreservation. The biological tests, albeit costly research in sheep generate important information on the survival of spermatozoa in the female reproductive tract and their fertilizing capacity.

Keywords: *fluorescent probes, objective analysis, semen, techniques.*

Introdução

A monta natural é o método mais seguro para mensurar a fertilidade do reprodutor, por meio da taxa de prenhez ou da taxa de não retorno ao estro. Todavia, trata-se de um processo demorado e com custo elevado (Larsson e Rodriguez-Martinez, 2000). Diante disso, há a necessidade de se adotarem métodos eficientes para estimar *in vitro* a fertilidade de reprodutores doadores de sêmen. A motilidade, a concentração e a morfologia espermáticas são características avaliadas classicamente nas amostras de sêmen (Arruda et al., 2010).

A avaliação da motilidade no sêmen fresco e diluído é considerada fundamental na análise laboratorial para prever a capacidade fertilizante dos espermatozoides em um ejaculado (Varner et al., 2008). A motilidade pode ser aferida de forma subjetiva ou objetiva. O modo subjetivo é feito por meio da pré-diluição do sêmen e da observação em microscopia óptica com a gradação em porcentagem das células em movimento. A análise subjetiva da motilidade é aceitável quando feita por técnico experiente (Varner et al., 2008). A análise objetiva



da motilidade é realizada por meio de equipamentos automatizados e *softwares* especializados, que avaliam a trajetória completa do espermatozoide por um período de tempo.

Ainda que os métodos subjetivos de análises sejam de grande valia para tentar prever a fertilidade de um macho, a subjetividade das técnicas diminui a sua repetibilidade e acurácia. Com o propósito de obter técnicas que demonstrem maior repetibilidade para avaliar tanto a morfologia quanto a função espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos (Verstegen et al., 2002; Arruda et al., 2010).

O objetivo deste trabalho é descrever as técnicas para análise de sêmen, bem como suas aplicações na avaliação da fertilidade de machos e na avaliação de partidas de sêmen criopreservado, além da pesquisa de novos diluidores e crioprotetores,

Análise da motilidade assistida por computador

O CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) é um sistema computadorizado e automático de captura e análise de sucessivas fotos dos espermatozoides, as quais, quando unidas, formam um filme com o trajeto de cada célula. Por esse sistema é possível obter informações mais precisas e acuradas do movimento de cada célula espermática (Amann e Kartz, 2004).

As imagens são capturadas por um sistema estroboscópico acoplado a um computador, que digitaliza as imagens, e um *software*, que as junta, formando o vídeo. O trajeto é obtido por meio de marcações de pontos onde a cabeça do espermatozoide está em cada foto. Embora seja o flagelo a parte do espermatozoide que propulsa o movimento, os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça porque é tecnicamente mais fácil acompanhar esse movimento do que o do flagelo (Amann e Katz, 2004).

Para cada espécie animal, o computador é programado com uma micrometragem mínima e outra máxima; objetos que tiverem tamanhos dentro dessa faixa são considerados espermatozoides. Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo do mínimo são consideradas parte do fundo (Mortimer e Maxwell, 1999).

Depois de identificado o espermatozoide, o *software* une as imagens, traçando, assim, a trajetória de cada célula. As células espermáticas são classificadas quanto ao seu movimento em padrões definidos: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (Mortimer e Maxwell, 1999). Para determinar esses padrões, são mensurados os seguintes parâmetros (Sousa, 2002):

- VAP – velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$); velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática. É a velocidade da trajetória média do espermatozoide.
- VSL – velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$). É a distância considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória dividida pelo tempo decorrido.
- VCL – velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$). É a distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem. É a velocidade da trajetória real do espermatozoide.
- ALH – amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm). Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.
- BCF – frequência de batimentos do flagelo (Hz). É determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção.
- STR – retilinearidade de (%) . É a medida do afastamento médio da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta. É calculada pela relação entre $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.
- LIN – linearidade (%). É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta. É a razão entre $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$.

Morfometria

Por meio de fotografias de alta resolução e *softwares* específicos, é possível analisar ultraestruturas do citoesqueleto do espermatozoide. As avaliações da morfometria espermática pelo sistema computadorizado (Automated Sperm Morphometry Analysis - ASMA) são realizadas, normalmente, por esfregaços corados, em aumento de 1.000x. Esses sistemas são programados para classificar objetos e diferenciar imagens das células espermáticas do detrito seminal e/ou superposição de células (Arruda et al., 2011).

Os parâmetros comumente aferidos em estudos que aplicam a técnica de morfometria espermática são a área que consiste na soma de todos os *pixels* contidos dentro das bordas da foto, o perímetro, ou seja, a soma dos *pixels* externos, o comprimento da cabeça, a largura da cabeça, a porcentagem de acrossomo (área do acrossomo/área da cabeça), a elipticidade (comprimento/largura), a alongação (comprimento - largura/comprimento + largura), a rugosidade ($4 \times \text{área}/\text{perímetro}^2$) e a regularidade (comprimento x largura/4xárea (Arruda et al., 2011;

Marti et al., 2011; Paz et al., 2012; Yaniz et al., 2012).

O uso da CASMA (Computer-assisted Sperm Morphometry Analysis) possibilitou diminuir a subjetividade na análise da morfologia espermática usada habitualmente. Estudos apontam a correlação entre as medições aferidas no CASMA e a fertilidade em várias espécies, incluindo os ovinos (Varner et al., 2008; Yaniz et al., 2012).

Segundo Yaniz et al. (2012), porém, outros fatores podem influenciar na análise do sêmen quando se utiliza o CASMA. Esses fatores são: preparação da amostra, tipo de coloração e fixação dos espermatozoides, programações dos *softwares* utilizados na análise, entre outros. Ainda de acordo com esses autores, o método ideal para análise morfométrica do espermatozoide deve ser automatizado, acurado, consistente e aplicável em diferentes tipos de preparação do esperma (preparação úmida e seca) e, ainda, barato.

Paz et al. (2012) compararam três metodologias para morfometria e tentaram correlacionar os resultados obtidos em cada um dos métodos com a fertilidade. Os métodos analisados foram o CASMA, o *software* NIS-Elements para análise da imagem capturada em microscopia óptica (MO-NIS) e, por fim, o mesmo *software* que analisa imagens capturadas em microscopia eletrônica (SEM-NIS). Houve diferença significativa nos dados encontrados entre as três metodologias. Somente os parâmetros avaliados pelo MO-NIS e SEM-NIS tiveram correlação com a fertilidade e, ainda assim, apenas as medições de área (MO-NIS) e alongação (SEM-NIS).

Utilização de sondas fluorescentes

Os corantes fluorescentes são sondas usadas na identificação de condições subcelulares, sendo possível a identificação de alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula (Sousa et al., 2013).

A leitura das amostras coradas com sondas fluorescentes pode ser feita em microscópio de fluorescência ou em citômetro de fluxo. Com a citometria de fluxo, é possível contar, examinar e classificar células em uma solução aquosa. Essa solução é direcionada a um fluxo linear, onde as células passam individualmente através de um feixe de luz ou laser. Esse feixe excita as sondas fluorescentes, ou fluorocromos, associadas às células e capta a frequência da luz. O equipamento converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados por *softwares* específicos. Por meio da citometria de fluxo, é possível medir a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes associadas às células, de forma imparcial, com inigualável precisão, sensibilidade, rapidez, em um número estatisticamente relevante de células (Cordelli et al., 2005).

Principais sondas fluorescentes utilizadas na análise do sêmen ovino

A Tab. 1 discrimina as principais sondas fluorescentes, assim como as estruturas analisadas, usadas na avaliação de espermatozoides de carneiros. Essas sondas podem ser utilizadas tanto na citometria de fluxo quanto na leitura manual em microscópio de fluorescência.

Tabela 1. Principais sondas fluorescentes usadas na avaliação espermática de ovinos, estrutura analisada, sítio de ligação, cor da fluorescência, referências. CFDA, 6-carboxifluoresceína; IP, iodeto de propídio; FIT-PSA, isotiocianato de fluoresceína associado à aglutinina do *Pisum sativum*; JC-1, iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,10,3,30-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; R123, rodamina 123.

Sonda	Estrutura analisada	Sítio de ligação	Cor	Referências
CFDA	Membrana plasmática	Citoplasma	Verde	Harrison e Vickers, 1990; Goularte et al., 2014
IP	Membrana plasmática	DNA	Vermelho	Harrison e Vickers, 1990; Celeghini et al., 2007
Hoechst 33342	Marcador celular	DNA	Azul	Hallap et al., 2006
FIT-PSA	Reação acrossomal	Membrana acrossomal externa	Verde	Celeghini et al., 2007
SYBR-14	Membrana plasmática	DNA	Verde	Mata-Campuzano et al., 2014
YO-PRO-1	Membrana plasmática	DNA	Verde	Hallap et al., 2006; Mata-Campuzano et al., 2014
JC-1	Potencial mitocondrial	Membrana mitocondrial	Verde e Laranja-avermelhado	Varner et al., 2008
R123	Potencial mitocondrial	Membrana mitocondrial	Verde	Tsakmakidis et al., 2010
Laranja de acridina	Desnaturação de DNA	de DNA	Verde e Vermelho	Martinez-Pastor et al., 2004; Garcia-Macias et al., 2006

Membrana plasmática

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. Os lipídeos das membranas celulares desempenham funções biológicas, como moléculas alimentares, depósitos de energia altamente concentrados, e promovem a sua integridade estrutural (Arruda et al., 2011). A integridade da membrana espermática é essencial na viabilidade seminal, pois garante a sua homeostase celular e, conseqüentemente, mantém as suas características de motilidade, sendo esses requisitos essenciais para manter a capacidade de fecundação da célula espermática.

O diacetado de 6-carboxifluoresceína (DIC) é um corante penetrável à membrana plasmática do espermatozoide. Enzimas presentes no citoplasma espermático convertem a molécula de DIC em fluoresceína, que emite uma fluorescência verde. Haverá a conversão do DIC em fluoresceína somente se a membrana plasmática da célula espermática estiver íntegra, pois a membrana plasmática lesada não possibilita a permeabilidade a esse corante. O iodeto de propídio (IP) tem afinidade com receptores localizados no DNA. O IP é um corante impenetrável à membrana plasmática, porém, quando esta apresenta alguma falha de continuidade, a molécula de IP consegue penetrar na célula e se ligar ao DNA. Quando isso ocorre, é emitida uma fluorescência vermelha (Harrison e Vickers, 1990; Arruda et al., 2011).

Ao se associar o DIC com o IP, é possível identificar três populações de espermatozoides. Os corados em verde não possuem a membrana plasmática lesada, por isso são considerados íntegros; os corados em vermelho são identificados como lesados, pois foi possível a penetração da sonda no DNA; e os lesados com acrossoma intacto são corados em verde com o núcleo vermelho (Harrison e Vickers, 1990; Arruda et al., 2011).

Harrison e Vickers (1990) adaptaram a metodologia de Garner et al. (1986) para avaliação da integridade da membrana plasmática com o uso do DIC e do IP. Os primeiros autores adicionaram pequenas quantidades de formaldeído à solução com as sondas e as amostras de sêmen com o intuito de imobilizar os espermatozoides. Como resultado, essa metodologia tornou-se mais sensível na avaliação da integridade da membrana plasmática.

O SYBR-14 tem afinidade pelo DNA, bem como a capacidade penetrante à membrana plasmática íntegra. O YO-PRO-1 também possui afinidade pelo DNA, mas a membrana plasmática do espermatozoide é impermeável ao corante. Essas duas sondas fluorescem em verde; por esse motivo, nunca são usadas juntas. Quando a membrana plasmática está íntegra, ela fluoresce em amostras coradas com o SYBR-14 e não fluorescem em experimentos que utilizem o YO-PRO-1 (Alvarez et al., 2012; Martinez-Rodriguez et al., 2012).

O Hoechst 33342 é usado como marcador de células e cora espermatozoides com a membrana intacta. Pode ser usado como marcador celular ou ainda na coloração para exames de morfometria espermática (Yaniz et al., 2012).

Reação acrossomal e capacitação espermática

Capacitação é um termo coletivo para as mudanças que um espermatozoide sofre quando entra em contato com o trato reprodutivo feminino, e essas incluem a reorganização de proteínas de membrana, o efluxo de colesterol da bicamada lipídica com conseqüente aumento da fluidez da membrana, a modulação da concentração iônica intracelular, o aumento da atividade da tirosina quinase e o desenvolvimento da motilidade hiperativada. A última alteração sofrida pelo espermatozoide no processo de capacitação é a reação acrossomal, iniciada imediatamente após a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, quando há a fusão entre membrana plasmática e acrossomal externa com posterior liberação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas (Arruda et al., 2010).

As aglutininas (amendoim –*Arachis hypogaea* – PNA, ou da ervilha – *Pisum sativum*–PSA) possuem afinidade por carboidratos presentes na membrana acrossomal externa, então elas são usadas para identificar espermatozoides que já iniciaram a reação acrossomal, ou seja, estão capacitados. O isotiocianato de fluoresceína (FIT) é um fluorocromo verde que é conjugado à aglutinina para possibilitar a visualização da reação (Arruda et al., 2010).

Quando o FIT-PSA é associado ao IP, é possível a identificação de quatro categorias: categoria 1 (FIT-PSA-/IP+), com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida; categoria 2 (FIT-PSA+/IP-), com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida; categoria 3 (FIT-PSA-/IP+), com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida; categoria 4 (FIT-PSA+/IP+), com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida (Celeghini et al., 2007).

Potencial mitocondrial

Ainda que não se saiba ao certo a relação do potencial mitocondrial e da fertilidade, a utilização de sondas fluorescentes na identificação do potencial de mitocôndria é considerada uma técnica boa de avaliação do sêmen ovino (Tsakmakidis et al., 2010). O potencial mitocondrial tem uma forte correlação com o potencial energético da célula e com a motilidade (Martinez-Pastor, 2004; Tsakmakidis et al., 2010), logo está



correlacionado com a fertilidade (Tsakmakidis et al., 2010).

O iodeto de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,10,3,30-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é usado para identificar o potencial mitocondrial do espermatozoide. Essa sonda produz uma mudança de membrana sensível ao padrão de cor, ou seja, a cor muda de verde para laranja-avermelhada conforme o aumento da polarização da membrana. Assim, quando o potencial de membrana é alto, existe a emissão de fluorescência laranja-avermelhada, em comparação com a formação monocromática verde de JC-1 em um estado de médio a baixo potencial de membrana mitocondrial (Varner et al., 2008; Martinez-Pastor et al., 2004). A rodamina 123 (R123) se difunde na membrana mitocondrial e o seu acúmulo em mitocôndrias funcionais causa uma fluorescência verde na região da peça intermediária (Tsakmakidis et al., 2010).

Estabilidade da cromatina

Espermatozoides afetados por danos no DNA podem ser considerados normais nos testes de motilidade e integridade de membrana comumente realizados nos laboratórios, porém podem induzir uma falha no desenvolvimento embrionário pós-fertilização (Varner et al., 2008; Tsakmakidis et al., 2010). Ainda que os testes de motilidade e integridade de membrana sejam importantes, esses testes podem não revelar lesões relevantes nos espermatozoides. Examinar o DNA da célula é valioso para identificar espermatozoides seriamente lesados (Lopez-Fernandes et al., 2008).

No teste de SCSA (teste da estrutura da cromatina no espermatozoide) é usada a sonda fluorescente laranja de acridina. Essa é uma sonda penetrante à membrana plasmática que fluoresce em verde quando combinada com um DNA intacto com dupla hélice e fluoresce em laranja quando combinada a um DNA desnaturado (Martinez-Pastor et al., 2004; Garcia-Macias et al., 2006).

Considerações finais

A predição da fertilidade é difícil por ter diversos aspectos envolvidos, porém, ao se associarem várias técnicas de avaliação do ejaculado, pode-se aproximar-se desse objetivo. Ainda que existam dificuldades na aplicação, as técnicas mais avançadas de avaliação do sêmen trazem mais repetibilidade e confiabilidade na pesquisa na área de ovinos.

Referências

- Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel E, Boixo JC, Mata-Campuzano M, Martinez-Pastor F, Anel L, Paz P.** Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, v.77, p.1111-1118, 2012.
- Amann RP, Katz DF.** Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-151, 2011.
- Arruda RL, Orros IR, Passos TS, Costa e Silva EV, Zúcaro CESN.** Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, p.168-184, 2010.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007.
- Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M.** Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, v.72, p.273-279, 2005.
- Garcia-Macias V, Martinez-Pastor F, Alvarez M, Garbe JJ, Anel E, Anel L, Paz P.** Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*, v.66, p.1921-1930, 2006.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM.** Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod*, vol.34, p.127-138, 1986.
- Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Gonçalves AO, Schneider JR, Corcini CD, Lucia Jr T.** Association between the presence of protein bands in ram seminal plasma and sperm tolerance to freezing. *Anim Reprod Sci*, v.146, p.165-169, 2014.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, p.343-352, 1990.
- Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology*, v.65, p.1122-1136, 2006.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H.** Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.327-336, 2000.



- López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálvez J.** Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram. Theriogenology*, v.70, p.898-908, 2008.
- Martí JI, Aparicio IM, García-Herreros M.** Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. *Theriogenology*, v.76, p.97-109, 2011.
- Martínez-Pastor F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, Anel L, Paz P, Rodríguez-Martínez H.** Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram sêmen. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.121-133, 2004.
- Martínez-Rodríguez C, Alvarez M, Ordás L, Chamorro CA, Martínez-Pastor F, Anel L, Paz P.** Evaluation of ram semen quality using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test. *Theriogenology*, v.77, p.1575-1586, 2012.
- Mata-Campuzano A, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, Paz P, Anel L, Martínez-Pastor F, Álvarez M.** Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: effect of temperature, extender and storage time. *Anim Reprod Sci*, v.151, p.137-147, 2014.
- Mortimer ST, Maxwell WMC.** Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Dev*, v.11, p.25-30, 1999.
- Paz P, Mata-Campuzano M, Tizado EJ, Álvarez M, Álvarez-Rodríguez M, Herraes P, Anel L.** The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology*, v.76, p.1313-1325, 2012.
- Sousa DB.** Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial. 2002. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.
- Sousa DB, Bicudo SD, Azevedo HC, Maia MS.** Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. *Vet Zootec*, v.20, p.649-657, 2012.
- Tsakmakidis IA.** Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Rumin Res*, v.92, p.126-130, 2010.
- Varner DD.** Developments in stallion sêmen evaluation. *Theriogenology*, v.70, p.448-462, 2008.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Yániz JL, Vicente-Fiel S, Capistrós S, Palacín I, Santolaria P.** Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology*, v.77, p.1343-1350, 2012.
-