

Avaliação espermática além do convencional: qualidade do sêmen felino pós- criopreservação

Sperm evaluation beyond the conventional: feline semen quality after cryopreservation

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo^{1*}, Maria Isabel Mello Martins²

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná- UENP, Bandeirantes, PR, Brasil

²Universidade Estadual de Londrina- UEL, Londrina, PR, Brasil

*E-mail: myrian.hidalgo@uenp.edu.br

Resumo

A criopreservação do sêmen felino possui aplicação direta em programas de reprodução assistida e na conservação de recursos genéticos. Além dos espermatozoides ejaculados, a recuperação epididimária possibilita o aproveitamento de gametas viáveis em situações como castração eletiva ou morte súbita, ampliando as estratégias de preservação genética. No entanto, os espermatozoides felinos apresentam elevada sensibilidade ao estresse osmótico e térmico durante o processo de criopreservação, o que pode comprometer a motilidade e a integridade estrutural. A avaliação *in vitro* é essencial para a predição da qualidade reprodutiva; entretanto, métodos convencionais nem sempre refletem o real estado funcional das células espermáticas, podendo resultar na perda de informações relevantes. Nesse contexto, esta revisão destaca a importância da incorporação de abordagens mais avançadas na avaliação espermática, visando aprimorar a eficiência dos protocolos de criopreservação em felinos de modo a contribuir para o avanço da reprodução tanto de espécimes de companhia quanto das estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: Sistema CASA, biotecnologia do sêmen, subpopulações espermáticas, análise proteômica, gato doméstico.

Abstract

Cryopreservation of feline semen has direct applications in assisted reproduction programs and the conservation of genetic resources. In addition to ejaculated spermatozoa, epididymal recovery enables the use of viable gametes in situations such as elective castration or sudden death, thereby expanding strategies for genetic preservation. However, feline spermatozoa exhibit high sensitivity to osmotic and thermal stress during the cryopreservation process, which may compromise motility and structural integrity. *In vitro* evaluation is essential for predicting reproductive quality; however, conventional methods do not always reflect the actual functional status of sperm cells, potentially leading to the loss of relevant information. Accordingly, this review highlights the importance of incorporating more advanced approaches in sperm evaluation, aiming to improve the efficiency of cryopreservation protocols in felines and to contribute to advances in reproduction, both in companion animals and in conservation strategies for endangered species.

Keywords: Computer-assisted sperm analysis (CASA), semen biotechnology, sperm subpopulations, proteomic analysis, domestic cat.

Introdução

O gato doméstico (*Felis catus*) tem sido amplamente utilizado como modelo experimental para estudos reprodutivos em felídeos selvagens, devido às similaridades fisiológicas e reprodutivas, o que permite que protocolos sejam adaptados para estratégias de conservação genética e reprodução assistida (Prochowska e Nizański, 2017, Bashawat et al., 2023, Santos e Silva, 2023). Nesse contexto, a criopreservação de espermatozoides destaca-se como uma importante biotecnologia, pois possibilita a conservação de gametas por longos períodos (Chatdarong, 2017).

Em felinos, os efeitos da criopreservação são variáveis (Buranaamnuay, 2017, Brusentsev et al., 2018), principalmente devido à elevada incidência de teratospermia; que aumenta a suscetibilidade das células espermáticas às crioinjúrias (Pukazhenthil et al., 2006). Sob essas condições, as alterações

osmóticas, choque térmico e/ou estresse oxidativo durante o processo podem comprometer a viabilidade e a capacidade fecundante (Cheuquemán et al., 2018).

A avaliação *in vitro* dos espermatozoides é fundamental para prever a qualidade reprodutiva do animal, pois permite estimar os danos causados aos gametas pela criopreservação e para a escolha do protocolo, diluente e o crioprotetor mais adequado e eficiente à proteção da célula (Cardoso et al., 2010). Na análise do sêmen, inclui-se: a avaliação da morfologia e da morfometria espermática, as quais fornecem informações importantes que podem se correlacionar com a fertilidade (De Paz et al., 2011) e a criorresistência (Ramón et al., 2013); e a análise computadorizada do sêmen (Computer-Assisted Semen Analysis- CASA), que é capaz de aferir inúmeros parâmetros cinemáticos (Verstegen et al., 2002, Kathiravan et al., 2011).

Sabe-se que o ejaculado do mamífero é heterogêneo, composto por subpopulações espermáticas, com diferentes padrões de motilidade (Quintero-Moreno et al., 2003). Embora o sistema CASA permita a análise da cinemática das células espermáticas e o registro individual das trajetórias celulares, são utilizados valores médios desses parâmetros, assumindo que o ejaculado é uniforme, o que causa perda de informações importantes (Amann e Waberski, 2014, Barbas et al., 2018). Nesse sentido, estudos que identifiquem as subpopulações são relevantes, visto que, sua distribuição pode estar relacionada às alterações fisiológicas das células, à variabilidade individual do macho, a fertilidade e à resposta aos processos de criopreservação (Núñez-Martínez et al., 2006, Souza et al., 2018).

Pesquisas indicam que a associação de diferentes técnicas proporciona uma avaliação mais precisa da fertilidade espermática (Gliozzi et al., 2017; Simonik et al., 2015). Desta forma, abordagens de análise molecular do sêmen, como o estudo das proteínas espermáticas, têm sido associados a taxas de fertilidade, contribuindo de forma relevante para seleção de animais em biotecnologias reprodutivas (Sergeant et al., 2019).

Avaliação espermática convencional

A primeira etapa para avaliação e criopreservação espermática é a colheita do sêmen, cujos métodos em felinos são diversos e dependentes das competências do técnico, de materiais disponíveis e das características comportamentais do macho (Carneiro e Motheo, 2023). Nesta espécie, a colheita apresenta muitos desafios, uma vez que o volume do ejaculado é baixo e a amostra colhida precisa ser suficientemente preservada para a análise espermática, inseminação ou criopreservação (Johnson, 2018).

Dentre os métodos de colheita espermática estão descritos, a eletroejaculação (Souza et al., 2018), vagina artificial (Villaverde et al., 2013), ejaculação farmacológica (Hidalgo et al., 2023, 2026) e colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo (Toyonaga; Tsutsui, 2012, Hidalgo et al., 2026).

A avaliação *in vitro* dos espermatozoides desempenha um papel fundamental na predição da qualidade reprodutiva do animal. Isso permite, ao implementar as biotecnologias reprodutivas estimar os danos aos gametas durante as etapas de criopreservação, permitindo a seleção do protocolo, diluente e/ou crioprotetor que ofereça melhor proteção à célula (Cardoso et al., 2010).

A morfologia espermática é um dos principais parâmetros relacionados à fertilidade, refletindo características genéticas e o potencial fecundante, e apresenta correlação positiva com a motilidade (Arruda et al., 2015). Em felinos é comum a ocorrência de teratozoospermia, caracterizada por mais de 60% de células anormais e redução da qualidade seminal fora da estação reprodutiva (Prochowska; Partyka; Nizański, 2021). A avaliação morfológica é realizada por meio de esfregaços corados ou microscopia DIC, com a análise de 200 células, e classificação dos defeitos em maiores e menores conforme seu impacto funcional (Arruda et al., 2011, 2015, CBRA, 2013).

A viabilidade espermática, especialmente relacionada à integridade da membrana plasmática, é outro parâmetro essencial, pois está diretamente envolvida na homeostase celular, capacitação, apoptose e fecundação (Naresh e Atreja, 2015). Essa avaliação pode ser realizada por diferentes métodos, como sondas fluorescentes, teste hiposmótico e coloração vital, com eosina/nigrosina, sendo esta última amplamente utilizada como complemento às análises de rotina (Arruda et al., 2011).

Inicialmente, a avaliação do movimento espermático era realizada de forma subjetiva, com a motilidade sendo classificada em porcentagem (0 a 100%) e o vigor avaliado em uma escala de 0 a 5 (CBRA, 2013). Para reduzir a subjetividade na avaliação da motilidade espermática, adotou-se o uso da análise computadorizada de sêmen (sistema CASA) que permite a identificação da cinética espermática e o registro individual de sua trajetória. Os principais parâmetros analisados pelo sistema CASA incluem: motilidade total (TM-%); motilidade progressiva (PM-%); velocidade média do trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$); velocidade em linha reta (VSL- $\mu\text{m/s}$); velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$); amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH- μm); frequência de batimentos cruzados flagelares (BCF-Hz); retilinearidade

(STR-%), resulta da relação entre VSL e VAP; linearidade (LIN-%) é a razão entre VSL e VCL (Kathiravan et al., 2011; Simonik et al., 2015). No entanto, as análises estatísticas aplicadas aos dados do sistema CASA geralmente se baseiam em valores médios obtidos de trajetórias de espermatozoides, o que pode mascarar os efeitos de diferentes tratamentos e desconsiderar a heterogeneidade intrínseca do ejaculado (Amann e Waberski, 2014, Barbas et al., 2018).

Análise de subpopulações espermáticas

Por muitos anos, o ejaculado foi considerado uma população celular homogênea; no entanto, evidências compiladas nas últimas décadas mostraram que um único ejaculado é composto por subpopulações distintas de espermatozoides. Essas subpopulações refletem espermatozoides em diferentes estados fisiológicos, que, por sua vez, modulam suas respostas funcionais às condições ambientais e aos desafios relacionados ao armazenamento (Quintero-Moreno et al., 2003, Souza et al., 2018).

Como descrito, as análises fornecidas pelo sistema CASA são baseadas em valores médios da cinemática espermática, não levando em consideração a variabilidade intrínseca do ejaculado (Amann e Waberski, 2014, Barbas et al., 2018). Para identificar todas as informações relevantes com mais acurácia, estudos propuseram o uso de *softwares* específicos e procedimentos estatísticos multivariados para compreender de forma mais detalhada o ejaculado das espécies, fornecendo dados significativos sobre as características biológicas do espermatozoide e as alterações comparando espécies (Vicente-Fiel et al., 2013), técnicas de colheita de sêmen (Vázquez et al., 2015) e mudanças nas características dessas células após a criopreservação (Núñez-Martínez et al., 2006, Souza et al., 2018).

Em estudo recente com felinos, Hidalgo e colaboradores (dados não publicados) observaram que, tanto espermatozoides provenientes da cateterização uretral quanto do epidídimo, a fresco, apresentaram a maior porcentagem da subpopulação 1 (61%- espermatozoides rápidos e lineares, baixo ALH), enquanto após a criopreservação houve predominância da subpopulação 3 (ejaculados: 47% e epidídimo: 77% - espermatozoides lentos e não lineares, baixo ALH). De modo geral, a criopreservação induziu alterações nos padrões cinemáticos dos espermatozoides em ambos os métodos de colheita. No entanto, os espermatozoides epididimários apresentaram uma maior mudança pós-descongelamento em direção ao SP3, indicando maior suscetibilidade dos espermatozoides epididimários a danos induzidos pela criopreservação.

Análise proteômica

O sucesso da fertilização não pode ser atribuído apenas ao número absoluto de espermatozoides viáveis, móveis ou morfológicamente normais, mas depende mais da competência funcional do espermatozoide (Sergeant et al., 2019, Carracedo et al., 2022; Prochowska; Eberhardt; Nizański, 2024).

Nos últimos anos, a pesquisa proteômica trouxe novas percepções sobre os processos específicos do espermatozoide, permitindo uma avaliação mais precisa da fertilidade no macho. Como resultado, muitos biomarcadores proteicos que revelam diferenças entre baixa e alta qualidade do sêmen e, consequentemente, entre indivíduos inférteis e férteis foram identificados (Sergeant et al., 2019, Almeida et al., 2022).

A proteína AKAP4 (proteína de ancoragem da quinase A) e seu precursor, proAKAP4, destacam-se como a principal proteína estrutural e funcional da bainha fibrosa do espermatozoide e estão localizados na parte principal do flagelo (Sergeant et al., 2019, Carracedo et al., 2022). A bainha fibrosa influencia o grau de flexibilidade, o plano de movimento flagelar e o tipo de batimento flagelar (Vijayaraghavan et al., 1999).

Em felinos, a concentração de proAKAP4 foi maior em espermatozoides ejaculados ($30,43 \pm 3,45$ ng/mL; 15,26–59,18) em comparação aos epididimários ($20,51 \pm 1,87$ ng/mL; 12,15–35,36) ($p = 0,004$). Nos ejaculados, observou-se correlação com TM ($r^2 = 0,660$; $p < 0,001$) e Dance ($r^2 = 0,266$; $p = 0,049$), enquanto nos epididimários houve associação com motilidade total ($r^2 = 0,668$; $p < 0,001$) e espermatozoides imóveis ($r^2 = 0,74$; $p = 0,003$). Esses resultados indicam que a proAKAP4 está relacionado aos parâmetros cinemáticos após a criopreservação, sendo um biomarcador promissor da motilidade espermática felina (Hidalgo et al., 2026).

Além da avaliação da proteína AKAP4, estudos proteômicos contribuem para a compreensão do papel de proteínas individuais em vários estágios da maturação espermática epididimária, capacitação, reação acrossômica e fusão espermatozoide-oócito (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2020). Em felinos, Hidalgo e colaboradores (dados não publicados), ao investigarem o proteoma espermático, identificaram

337 proteínas em amostras de ejaculado e epidídimo, sendo 88 proteínas comuns entre os grupos. A análise de enriquecimento da ontologia gênica (função molecular) revelou predominância de proteínas relacionadas à ligação de pequenas moléculas no ejaculado, enquanto, nas amostras epididimárias, observou-se associação com múltiplas funções, destacando-se aquelas relacionadas à ligação de nucleotídeos e ribonucleotídeos. As proteínas em maior abundância no ejaculado em comparação com o epidídimo foram as estruturais. Em contrapartida, as proteínas encontradas em menor abundância no ejaculado foram aquelas associadas a processos mediados por cálcio, como motilidade espermática, morte celular e liberação hormonal; ligação ao ATP; espermatogênese; transporte de proteínas; processos catabólicos e transcrição.

Esses dados fornecem subsídios à caracterização funcional das proteínas nos processos biológicos, ampliando as perspectivas de sua aplicação como biomarcadores de fertilidade, bem como no aprimoramento de técnicas de criopreservação.

Considerações finais

A criopreservação do sêmen felino é uma ferramenta essencial para a reprodução assistida e conservação genética; contudo, sua eficiência ainda é limitada pela sensibilidade espermática e pela elevada incidência de teratozoospermia. Embora as avaliações espermáticas convencionais sejam amplamente utilizadas, sua abordagem baseada em valores médios não contempla a heterogeneidade do ejaculado, podendo ocultar informações relevantes. Nesse contexto, a análise de subpopulações espermáticas e a análise proteômica, ampliam a compreensão da funcionalidade espermática e possibilitam o aprimoramento dos protocolos de criopreservação e da predição da fertilidade em felinos.

Referências

- Almeida ABM, Hidalgo MMT, Moraes FLZ, Trautwein LGC, Schnitzer JF, Silva LAS, Rizzoto G, Ferreira JCP, MARTINS MIM.** The proAKAP4 concentrations in Nelore bull sperm and their relation to FTAI conception rate results. *Animal Reproduction Science*, v. 247, 2022.
- Amann RP, Wabersk D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 5- 17.e3, 2014.
- Arruda RP Silva D, Affonso F, Lemes K, Jaimes J, Alonso M, Carvalho H, Oliveira L, Nascimento J.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 145– 151, 2011.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Garcia AR, Carli G, Leite TG, Oliveira L. Z, Lançoni R, Rodrigues MDP.** Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 39, n. 1, p. 47–60, 2015.
- Barbas JP, Leahy T, Horta AE, García-Herreros M.** Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology*, v. 82, p. 137–147, 2018.
- Bashawat M, Braun BC, Müller K, Hermann BP.** Molecular phenotyping of domestic cat (*Felis catus*) testicular cells across postnatal development – A model for wild felids. *Theriogenology Wild*, v. 2, p. 100031, 2023.
- Brusentsev E, Kizilova E., Mokrousova V, Kozhevnikova V, Rozhkova I, Amstislavsky S.** Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media. *Theriogenology*, v. 110, p. 148–152, 2018.
- Buranaamnuay K.** Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A review. *Animal Reproduction Science*, v. 183, p. 56–65, 2017.
- Carracedo S, Briand-Amirat L, Dordas-Perpinyà M, Ramos Escuredo Y, Del Combel R, Sergeant N, Delehedde M.** ProAKAP4 protein marker: Towards a functional approach to male fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 247, 2022.
- Cardoso JFS, Paula NRO, Uchoa DC, Silva LDM.** Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 146–152, 2010.
- Carneiro, JS, Motheo TF.** Pharmacological semen collection in domestic and wild canids and felids: literature review. *Animal Reproduction*, v. 20, n. 4, p. 41 e20230036, 2023.
- CBRA.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3rd. 2013.
- Chatdarong K.** Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, p. 261–264, 2017.

- Cheuquemán C, Faúndez R, Sánchez R, Risopatrón J.** Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*, v. 50, n. 9, p. 1–8, 2018.
- De Paz P, Mata-Campuzano M, Tizado, EJ, 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.
- Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C, Pizzi F.** The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, p. 1–8, 2017.
- Hidalgo MMT, Almeida ABM, Silva LAS, Gregghi JR, Silva VW, Sambatti NR, Trautwein LGC, Martins MIM.** Comparison of two pharmacological semen collection times with $\alpha 2$ -adrenergic agonist in domestic cats. *Reproduction in Domestic Animals*, p. 1–7, 2023.
- Hidalgo MMT, Almeida ABM, Silva LAS, Silva VW, Gregghi JR, Sambatti NR, Trautwein LGC, Martins MIM.** ProAKAP4 as a protein marker of sperm quality: Insights from frozen-thawed ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology*, v.250, p. 117698, 2026.
- Johnson AK.** Assisted Reproduction in the Male Cat. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 48, n. 4, p. 511–521, 2018.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G.** Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 1, p. 165–172, 2011.
- Mogielnicka-Brzozowska M, Prochowska S, Nizański W, Bromke MA, Wiśniewski J, Olejnik B, Kuzborska A, Fraser L, Mlynarz P, Kordan W.** Proteome of cat semen obtained after urethral catheterization. *Theriogenology*, v. 141, p. 68-81, 2020.
- Naresh S, Atreja SK.** Detection, Localization and Tyrosine Phosphorylation Status of Ser/Thr Protein Phosphatase γ in Freshly Ejaculated, In Vitro Capacitated and Cryopreserved Buffalo Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, n. 6, p. 901–909, 2015.
- Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ.** A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, n. 5, p. 408–415, 2006.
- Prochowska S, Nizański W.** In vitro fertilizing potential of urethral and epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v.20, n.1, p.19–24, 2017.
- Prochowska S, Partyka, Nizański W.** Expression of apoptosis-related 20 genes in cat testicular tissue in relation to sperm morphology and seasonality—a 21 preliminary study. *Animals*, v. 11, n. 2, p. 1–10, 2021.
- Prochowska S, Eberhardt, M, Nizański W.** Evaluation of a commercial proAKAP4 kit for the assessment of fresh and frozen–thawed feline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 59, n. 3, 2024.
- Pukazhenthii B, Neubauer K, Jewgenow K, Howard J, Wildt D.** The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, v. 66, n. 1, p. 112–121, 2006.
- Quintero-Moreno A, Miró J, Teresa Rigau A, Rodríguez-Gil JE.** Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v. 59, n. 9, p. 1973–1990, 2003.
- Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS, Garde JJ.** Sperm Population Structure and Male Fertility: An Intraspecific Study of Sperm Design and Velocity in Red Deer1. *Biology of Reproduction*, v. 89, n. 5, p. 1–7, 2013.
- Santos LC, Silva JFM.** Molecular factors involved in the reproductive morphophysiology of female domestic cat (*Felis catus*). *Animals*, v. 13, n. 19, p. 3153, 2023.
- Sergeant N, Briand-Amirat L, Bencharif D, Delehedde M.** The Sperm Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and Fertility. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, v. 11, n. 1, 2019.
- Simonik O, Sichtar J, Krejcarkova A, Rajmon, R, Stadnik L, Beran J, Dolezalova M, Biniova Z.** Computer assisted sperm analysis - The relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 85, n. 1, p. 3–11, 2015.
- Souza AK, Trautwein LGC, Paranzini CS, Perencin FM, Cardoso GS, Martins MIM.** Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats. *Animal Reproduction Science*, v. 189, p. 1–10, 2018.
- Toyonaga M, Tsutsui T.** The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides using seminal plasma. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.74, n.10, p.1349–1353, 2012.
- Vázquez AJF, Cedillo MJ, Quezada VJ, Rivas AC, Morales ECL, Ayala EME, Hernández MJ, González RA, Aragón MA.** Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Animal Reproduction Science*, v.154, p.29–38, 2015.

Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Yániz JL. 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.

Villaverde AISB, Fioratti EG, Penitenti M, Ikoma MRV, Tsunemi, MH, Papa FO, Lopes MD. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology*, v.80, n.7, p.730-26 737, 2013.

Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE, Carr DW. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm- specific protein kinase A- anchoring protein. *Molecular Endocrinology*, v.13, n.5, p.705-717, 1999.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.
