

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA E ACROSSOMAL DE ESPERMATOZÓIDES DE GATO DOMÉSTICO (*FELIS CATUS*)

ANA IZABEL SILVA BALBIN VILLAVERDE,¹ CELY MARINI MELO,² JOSÉ EDUARDO CORRENTE,³
FREDERICO OZANAM PAPA⁴ E MARIA DENISE LOPES⁵

1. Aluna de pós-graduação da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
2. Mestre, bolsista da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
3. Professor doutor, Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu
4. Professor doutor, FMVZ, UNESP - Botucatu
5. Professora doutora, FMVZ, UNESP - Botucatu

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência do método de coloração Karras modificado (KA) para a análise da morfologia espermática no gato doméstico através da comparação com a coloração Fast Green FCF/Rosa Bengala (FR), previamente utilizada para esta espécie. Utilizaram-se quatro gatos adultos, colhendo-se quatro vezes amostras de sêmen em dias alternados para cada animal através de vagina artificial (n=16 ejaculados). Para cada ejaculado, realizaram-se duas colorações. Para a coloração FR, o sêmen *in natura* foi diluído em citrato de sódio 2,9% e, posteriormente, em solução de coloração. Após setenta segundos, procedeu-se a esfregaços em lâminas, as quais foram secas a 37°C. Para a coloração KA, os esfregaços previamente confeccionados e fixados em formol salino

no foram imersos seqüencialmente nas soluções de Rosa Bengala, Tanino e Azul Vitória e secas em temperatura ambiente. Avaliaram-se duzentas células para cada tipo de coloração em todos os ejaculados, usando-se microscópio de luz em aumento de 1.000X. Efetuou-se análise estatística mediante o teste não-paramétrico de Wilcoxon, estabelecendo diferença significativa quando $p < 0,05$. Para a coloração de KA, obtiveram-se maior porcentagem de gota citoplasmática distal e menor porcentagem de defeitos de cabeça quando comparada à coloração FR. Assim, nenhuma das colorações mostrou-se totalmente eficiente na identificação dos defeitos de morfologia encontrados na avaliação do sêmen *in natura* de gatos domésticos.

PALAVRAS-CHAVES: Acrossomo, coloração, espermatozóide, gato doméstico, morfologia espermática.

ABSTRACT

COMPARISON BETWEEN TWO METHODS OF STAINING FOR ASSESSMENT OF MORPHOLOGY AND ACROSOME IN DOMESTIC CAT (*FELIS CATUS*) SPERMATOZOA

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the modified Karras staining technique (KA) to analyze domestic cat sperm morphology by comparing it with the Fast Green FCF/ Rose Bengal staining (FR), previously used for this species. Four adult cats were used, from which sperm samples were collected four times in alternate days for each tom using an artificial vagina (n=16 ejaculates). Both staining techniques were performed for each ejaculate. For the FR staining technique, the semen *in*

natura was diluted in 2.9% sodium citrate and, afterwards, in the staining solution. After 70 seconds, smears were made onto slide and dried at 37°C. For the KA staining technique, previously made and formol saline fixed slides were sequentially immersed in Rose Bengal solution, Tannin solution, and Victoria Blue B solution, and dried at room temperature. For sperm evaluation, 200 sperm cells were assessed for each staining technique in all ejaculate samples using a bright field microscope at 1000X magnification. Statistical

analysis used the non-parametric Wilcoxon test, establishing significance at $p < 0.05$. For the KA staining technique, higher percentage of distal cytoplasmic droplets and lower percentage of sperm head defects were obtained when com-

pared to the FR staining technique. This way, both staining techniques were not totally efficient for the assessment of morphological defects found in the domestic cat *in natura* spermatozoa.

KEY WORDS: Acrosome, domestic cat, spermatozoa, sperm morphology, staining.

INTRODU O

Os testes *in vitro*, utilizados para a avalia o dos espermatozóides, s o ferramentas importantes, uma vez que oferecerem indícios sobre a capacidade fertilizante dessas células. Dentre esses testes estão incluídas a análise morfológica e a determina o da integridade acrossomal, as quais demonstram rela o direta com a capacidade fertilizante dos espermatozóides em espécies como: bovina (HANCOCK, 1959; PEET et al., 1988; ANDERSSON et al., 1990), eqüina (JASKO et al., 1990; JASKO et al., 1992), suína (HANCOCK, 1959), ovina (HANCOCK, 1959), canina (RENTON et al., 1986; MICKELSEN et al., 1993; OETTLE, 1993; CARDOSO et al., 2007) e humana (VAWDA et al., 1996). Uma correla o positiva foi encontrada entre a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais e a taxa de fertilidade *in vivo* na espécie canina (MICKELSEN et al., 1993; OETTLE, 1993). Nos gatos domésticos, a morfologia espermática também tem sido relacionada   fertilidade *in vitro*, pois ejaculados com mais de 60% de altera es morfológicas resultam em taxas menores de penetra o da zona pelúcida quando comparados com ejaculados apresentando menos de 40% de formas anormais (HOWARD et al., 1991).

Na família *Felidae*, uma alta incidência de teratospermia, animais apresentando mais de 60% de espermatozóides morfolologicamente anormais,   freqüentemente observada (HOWARD, 1993). Adicionalmente, existem diferenças fundamentais entre esses dois grupos de animais, normosp rmicos e teratosp rmicos, como: maior susceptibilidade da membrana plasmática aos danos induzidos pela refrigera o, maior sensibilidade ao estresse osmótico, menor estabilidade do DNA, menor capacidade de fertiliza o após

inje o espermática intracitoplasmática e maior tempo para capacita o espermática e rea o acrossomal *in vitro* para os animais teratosp rmicos (PUKAZHENTHI et al., 2001). Por essa razão, tanto a avalia o morfológica de amostras de sêmen quanto a identifica o dos animais teratosp rmicos são essenciais.

As avalia es da morfologia espermática e/ou da integridade acrossomal podem ser realizadas através de prepara es  midas (SAACKE & MARSHALL, 1968; PURSEL et al., 1972), esfregaços corados (WILLIAMS, 1920; HANCOCK, 1952; WELLS & AWA, 1970; DIDION et al., 1989; TALBOT & CHACON, 1981a,b; PAPA et al., 1988) ou sondas fluorescentes (TALBOT & CHACON, 1980; CROSS et al., 1986; KALLAJOKI et al., 1986; MORTIMER et al., 1987).

Para o gato doméstico, demonstrou-se que, embora a prepara o úmida permita uma avalia o da morfologia espermática sem artefatos induzidos pelo processo de colora o (ZAMBELLI et al., 1993; SCH FER & HOLZMANN, 2000), o esfregaço corado permite melhor visualiza o do acrossomo (POPE et al., 1991). Nesse contexto, a colora o Fast Green FCF/Rosa Bengala (FR) se mostrou um método simples e confiável para a colora o espermática em felinos (POPE et al., 1991), permitindo a avalia o morfológica e de integridade acrossomal simultaneamente. Contudo, apesar de o Fast Green FCF/Rosa Bengala ser uma colora o eficiente para os felinos, nem todos os laboratórios dispõem desse corante, fazendo-se necessária, assim, a busca de técnicas de colora o alternativas, simples e confiáveis para uso na rotina da avalia o andrológica nos felinos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do método de Karras modificado (KA)

por PAPA et al. (1988), utilizado para espermatozóides de touro, cavalo, cão, bode, carneiro e homem, para a análise da morfologia espermática e da integridade acrossomal no gato doméstico através de comparação com a coloração Fast Green FCF/Rosa Bengala (FR), recomendada para essa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se quatro gatos (entre 1,5 e 7 anos) mantidos em fotoperíodo natural com mais de doze horas de luz por dia e alimentados com ração seca (Friskies, Nestlé/Purina) e água *ad libitum*. Cada animal foi submetido a quatro colheitas de sêmen em dias alternados com a utilização de vagina artificial (SOJKA et al., 1970), totalizando dezesseis amostras de sêmen.

Preparação dos corantes

Para a coloração de KA modificado, utilizaram-se três soluções: 1) Rosa Bengala [3g de Rosa Bengala, 1mL de formol salino (30 a 40%), 100mL de água destilada] (pH=6,9), 2) Tanino [1g de casca de barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*), fervida em 20mL de água destilada por cinco minutos, filtrada a quente e conservada em refrigerador] (pH=4,5), 3) Azul Vitória (3g de Azul Vitória em 100mL de álcool metílico e, após três a quatro semanas em estufa a 37° C, diluição de 20mL dessa solução em 80mL de água destilada) (pH=3,2) (PAPA et al., 1988).

Preparou-se a solução para a coloração de FR com 1% (p/v) de Rosa Bengala, 1% (p/v) de Fast Green FCF e 40% de etanol em tampão de McIlvaine's (0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato dissódico), ajustando o pH da solução final entre 7,2 a 7,3 (POPE et al., 1991).

Técnica de coloração

Para a técnica de coloração KA, elaboraram-se esfregaços em lâmina utilizando-se 5µl do sêmen *in natura* para cada amostra colhida (n=16) e duas lâminas por amostra. Fixaram-se as lâminas, após secagem em temperatura ambiente, em formol salino, mergulhando-as de duas a

três vezes em imersões rápidas e secagem a 37° C em placa aquecedora. Após fixação, as lâminas foram imersas em três soluções de coloração na seqüência: 1) dois minutos em solução de Rosa Bengala, 2) um minuto em solução de Tanino, 3) trinta segundos em solução de Azul Vitória, realizando-se lavagem das lâminas em água corrente sempre após cada imersão nas soluções. As lâminas após coloração foram secas em temperatura ambiente (PAPA et al., 1988).

Na coloração de FR, para cada amostra colhida (n=16), 5µl do sêmen *in natura* foram adicionados a 45µl de citrato de sódio 2,9%. A essa mistura adicionou-se a solução de coloração e, após setenta segundos em temperatura ambiente, foram realizados esfregaços em lâminas utilizando de 5 a 10µl da solução final. Para cada amostra prepararam-se duas lâminas. As lâminas foram deixadas secar à temperatura de 37° C (POPE et al., 1991).

Avaliação morfológica

Para cada amostra colhida e tipo de coloração procedeu-se à avaliação de duzentas células utilizando microscópio óptico com aumento de 1.000X e à classificação das anormalidades espermáticas realizada de acordo com MIES FILHO (1987). Classificou-se o acrossomo como intacto quando toda a região acrossomal das células espermáticas foi corada em azul-escuro (KA) ou azul-arroxeadado (FR) e lesado, ou ausente quando a região acrossomal se apresentava rosa-claro (FR e KA) ou com apenas alguns pontos azuis-arroxeados (FR).

Análise estatística

As médias obtidas para cada anormalidade espermática em todos os ejaculados avaliados foram comparadas entre as duas técnicas de coloração através do teste não-paramétrico de Wilcoxon, estabelecendo diferença significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

As médias para cada patologia espermática de todos os ejaculados nas duas técnicas de colo-

ração se encontram na Tabela 1. Para a coloração FR foi observada maior ($p < 0,05$) porcentagem de patologias de cabeça, enquanto que para a coloração de KA obteve-se maior ($p < 0,05$) frequência de gota citoplasmática distal. Para as demais patologias espermáticas, não se observou diferença significativa entre as duas técnicas de coloração utilizadas. As anormalidades espermáticas mais frequentes foram: cauda fortemente dobrada ou enrolada, gota citoplasmática distal, ausência do acrossomo, peça intermediária dobrada, cabeça isolada, formas duplas e gota citoplasmática distal.

TABELA 1. Médias e desvio-padrão das patologias espermáticas encontradas em amostras de sêmen ($n=16$) de gato doméstico avaliadas pelas colorações de Karras modificado e Fast Green/ Rosa Bengala, Botucatu, SP, 2007

Patologia	Método de coloração	
	Karras modificado	Fast Green/Rosa Bengala
Acrossomo	6,75 ± 3,77 ^a	6,22 ± 3,75 ^a
Patologia de cabeça	3,72 ± 3,48 ^a	4,94 ± 4,32 ^b
Patologia de peça intermediária	7,50 ± 6,52 ^a	8,16 ± 6,77 ^a
Patologia de cauda	26,84 ± 21,32 ^a	27,94 ± 18,74 ^a
Patologia de implantação	0,94 ± 1,14 ^a	0,66 ± 0,79 ^a
Gota citoplasmática distal	18,91 ± 15,56 ^a	2,34 ± 1,79 ^b
Gota citoplasmática proximal	0,31 ± 0,51 ^a	0,06 ± 0,17 ^a
Formas teratospérmicas	0,03 ± 0,13 ^a	0,16 ± 0,35 ^a
Formas duplas	0,31 ± 0,54 ^a	0,22 ± 0,31 ^a

Letras distintas na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,05$).

p = nível de significância estatística para cada patologia entre os dois métodos de coloração (teste não paramétrico de Wilcoxon).

DISCUSSÃO

O principal objetivo de uma técnica de coloração espermática é facilitar a visualização dos

espermatozoides e, assim, propiciar melhor discernimento das patologias existentes.

Dentro desse contexto, a análise da integridade do acrossomo é um dos itens importantes na avaliação do potencial de fertilização do animal, principalmente, em amostras de sêmen descongelado (BEDFORD, 1983).

A técnica de preparação úmida, utilizando contraste de fase (HANCOCK, 1952), apesar de conservar mais bem as características morfológicas das células espermáticas (ZAMBELLI et al., 1993), oferece baixa visualização do acrossomo nos gatos (WILDT et al., 1987), em virtude do tamanho pequeno dessa estrutura nessa espécie (SCHMEHL & GRAHAM, 1989). Por sua vez, as sondas fluorescentes, indicadas para a avaliação da integridade acrossomal, apesar de apresentarem maior intensidade na marcação do acrossomo e, conseqüentemente, menor ambigüidade durante a avaliação (CROSS & MEIZEL, 1989), necessitam de equipamentos mais específicos e dispendiosos. Assim, para a avaliação da integridade acrossomal, a alternativa mais acessível ainda é a utilização de esfregãos corados.

Para o gato doméstico, corantes como FR (POPE et al., 1991; ZAMBELLI et al., 1993), *triple stain* (POPE et al., 1991) ou SpermacTM (SCHÄFER & HOLZMANN, 2000) podem ser utilizados para a visualização do acrossomo em microscopia de luz. A coloração de FR, comparada a outros corantes como o *triple stain* para a avaliação do sêmen em felinos, além de mais simples, resultou em melhor diferenciação das estruturas espermáticas, incluindo a acrossomal, com menor quantidade de artefatos (POPE et al., 1991; ZAMBELLI et al. 1993).

Os meios usados para a diluição das amostras de sêmen, previamente à coloração, podem interagir com os corantes utilizados e levar a alterações nos padrões de coloração. Por exemplo, foi observado que a gema de ovo e o glicerol podem afetar negativamente colorações como o FR, em razão da aglutinação da gema de ovo e ausência de diferenciação das estruturas espermáticas pela presença do glicerol (ZAMBELLI et al., 1993). Neste estudo foi utilizado apenas sêmen *in natura*, excluindo-se, dessa forma, a

interferência do meio sobre a visualização das células espermáticas.

Anteriormente a este estudo, o único relato utilizando os mesmos corantes da técnica de KA, Rosa Bengala e Azul Vitória, para coloração espermática em gato doméstico, foi feito por ZAMBELLI et al. (1993). Esses autores encontraram um número elevado de acrossomos classificados como reagidos, provavelmente, resultado da discreta diferenciação das estruturas espermáticas pelos corantes utilizados. Ao contrário do observado por ZAMBELLI et al. (1993), neste estudo, utilizando os corantes Rosa Bengala e Azul Vitória, obteve-se boa diferenciação das estruturas espermáticas, incluindo a visualização do acrossomo, como observado anteriormente para outras espécies de animais domésticos (PAPA et al., 1988). Apesar da boa visualização das células espermáticas no presente estudo, uma porcentagem ligeiramente menor de patologias localizadas na região da cabeça foi observada nas amostras coradas com KA quando comparadas aos resultados obtidos com a coloração FR. Os resultados conflitantes entre esses dois estudos podem estar relacionados a diferenças no método de fixação, preparo e tempo de exposição aos corantes Rosa Bengala e/ou Azul Vitória ou ao adstringente utilizado para a técnica de coloração.

Para o gato doméstico, demonstrou-se que a solução de Hancock e Gledhill foi mais eficiente em manter a integridade das gotas citoplasmáticas (ZAMBELLI et al., 1993). Neste estudo, observou-se uma porcentagem maior de gota citoplasmática distal utilizando a coloração de KA comparada à coloração FR. Essa redução na visualização das gotas citoplasmáticas foi, previamente, relatada em outras técnicas de coloração espermática para o gato doméstico (ZAMBELLI et al., 1993; SCHÄFER & HOLZMANN, 2000). Dessa forma, pode-se deduzir que talvez o processamento do sêmen para a técnica de coloração FR possa ter levado a um desprendimento das gotas citoplasmáticas distais ou que a coloração de FR, possivelmente, não apresenta boa coloração dessas estruturas, levando, assim, a uma visualização reduzida destas.

CONCLUSÃO

Apesar de as duas técnicas de coloração utilizadas neste estudo terem permitido uma boa visualização das estruturas espermáticas, foram observadas tanto menor eficiência na detecção de defeitos de cabeça nas amostras coradas com KA quanto menor frequência de gotas citoplasmáticas distais na coloração de FR. Dessa forma, ambas as colorações não foram totalmente eficientes na identificação dos defeitos de morfologia encontrados na avaliação do sêmen *in natura* de gatos domésticos.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo apoio financeiro, à Purina/Nestlé, pelo fornecimento de ração, e à Merial, pela doação de medicamentos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, M.; VIERULA, M.; ALANKO, M. Three types of acrosomal aberrations of bull spermatozoa and their relation to fertility. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 31, p. 175-179, 1990.
- BEDFORD, J.M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian animals. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 108-120, 1983.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F.; LOPES, D.M. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106® using an *in vitro* sperm-oocyte interaction assay. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p.11-16, 2007.
- CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal *status* of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 187-212, 1986.
- DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22, p. 51-57, 1989.

- HANCOCK, H. The morphology of bull spermatozoa. **Journal of Experimental Biology**, v. 29, p. 445-453, 1952.
- HANCOCK, J.L. The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility. **International Journal of Fertility**, v. 4, p. 347-359, 1959.
- HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 36-45, 1991.
- HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M.E. **Zoo and wild animal medicine: current therapy**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 390-399.
- JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 389-393, 1990.
- JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987 - 1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 979-985, 1992.
- KALLAJOKI, M.; VIRTANEN, I.; SUOMINEN, J. The fate of acrosomal staining during the acrosome reaction of human spermatozoa as revealed by a monoclonal antibody and PNA-lectin. **International Journal of Andrology**, v. 9, p. 181-194, 1986.
- MICKELSEN, W.D.; MEMON, M.A.; ANDERSON, P.B.; FREEMAN, D.A. The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. **Theriogenology**, v. 39, p. 553-560, 1993.
- MIES FILHO, A. **Reprodu o dos animais e insemina o artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 2 v. 783 p.
- MORTIMER, D.; CURTIS, E.F.; MILLER, R.G. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 127-135, 1987.
- OETTLE, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 257-260, 1993.
- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M.; BICUDO, S.D.; RAMIRES, P.R.N.; LOPES, M.D. Colora o espermática segundo Karras modificada pelo emprego do Barbatim o (*Stryphnodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterin ria e Zootecnia**, v. 40, p. 115-123, 1988.
- PEET, R.L.; KLUCK, P.; MCCARTHY, M. Infertility in 2 Murray Grey bulls associated with abaxial and swollen midpiece sperm defects. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, p. 359-360, 1988.
- POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, p. 87-95, 1991.
- PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 423-433, 2001.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v. 34, p. 278-283, 1972.
- RENTON, J.P.; HARVEY, M.J.A.; HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Veterinary Records**, v. 118, p. 429-430, 1986.
- SAACKE, R.G.; MARSHALL, C.E. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 16, p. 511-514, 1968.
- SCH AFER, S.; HOLZMANN, A. The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 201-211, 2000.
- SCHMEHL, M.L.; GRAHAM, E.F. Ultrastructure of the domestic tom cat (*Felis domestica*) and tiger (*Panthera tigris altaica*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 31, p. 861-874, 1989.
- SOJKA, N.J.; JENNINGS, L.L.; HAMNER, C.E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus L.*). **Laboratory Animal Care**, v. 20, p. 198-204, 1970.
- TALBOT, P.; CHACON, R. A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. **Gamete Research**, v. 3, p. 211-216, 1980.
- TALBOT, P.; CHACON, R. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 15, p. 201-208, 1981a.

- TALBOT, P.; CHACON, R. Observations on the acrosome reaction of human sperm. **American Journal Primatology**, v. 1, p. 211-219, 1981b.
- VAWDA, A.L.; GUNBY, J.; YOUNGLAI, E.V. Semen parameters as predictors of *in vitro* fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1445-1450, 1996.
- WELLS, M.E.; AWA, O.A. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 227-232, 1970.
- WILDT, D.E.; PHILLIPS, L.G.; SIMMONS, L.G.; GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M. Seminal-endocrine characteristics of the tiger and the potential for artificial breeding. In: TILSON, R.L.; SEAL, U.S. (Eds.). **Tigers of the world: biology, biopolitics, management and conservation of an endangered species**. New Jersey: Noyes Publications, 1987. p. 255-279.
- WILLIAMS, W.W. Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. **Cornell Veterinarian**, v. 10, p. 87-94, 1920.
- ZAMBELLI, D. BERGONZONI, M.L.; DeFANTI, C.; CARLUCCIO, A. Tecniche per la valutazione morfologica degli spermatozoi di gatto, coniglio e cane. **Atti del Convegno Nazionale SISVET XLVII Riccione**, v. 29, p. 279-283, 1993.

Protocolado em: 21 nov. 2006. Aceito em: 25 fev. 2008.