

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA**

ANA BEATRIZ FRANCHINI

**MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE
ESPERMATOZOIDES DE SUÍNOS**

**UBERLÂNDIA
2026**

ANA BEATRIZ FRANCHINI

**MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE
ESPERMATOZOIDES DE SUÍNOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária, da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito parcial à
obtenção do título de Médico Veterinário

Orientadora: Prof. Dra. Teresinha Inês de
Assumpção

UBERLÂNDIA

2026

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar cinco diferentes técnicas de coloração de espermatozoides no sêmen de suíno. O estudo utilizou os seguintes corantes: eosina-nigrosina, rosa bengala, POPE, giemsa e vermelho-congo e seguiu os protocolos padrão. Foram utilizadas doses comerciais refrigeradas de sêmen, de quatro reprodutores diferentes, provenientes de uma central de processamento de sêmen. Para cada técnica de coloração, foram confeccionadas três lâminas por amostra, totalizando 12 lâminas por tratamento. A avaliação foi realizada em microscopia óptica sob aumento de 1000x, analisando 200 espermatozoides por lâmina. Os espermatozoides foram analisados e avaliados monitorando possíveis interferências técnicas como padrão da coloração, formação de artefatos, aglutinações e dificuldade na análise das células. O resultado evidenciou diferenças quanto ao desempenho na coloração das amostras seminais e na qualidade da visualização microscópica, sendo que técnicas de eosina-nigrosina, rosa bengala e POPE apresentaram coloração homogênea dos espermatozoides, proporcionando adequado contraste, sem artefatos e boa definição das estruturas celulares, enquanto a de giemsa não promoveu a coloração dos espermatozoides e a de vermelho congo resultou na formação de um artefato localizado na região da cabeça dos espermatozoides. Todas as técnicas possuem potencial de aplicação em análises espermáticas dos suínos, porém não com a mesma eficiência e qualidade para análise microscópica

Palavras-chave: análise espermática; coloração de esfregaços; reprodução, sêmen, suíno.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate five different sperm staining techniques for boar semen. The following stains were evaluated: eosin-nigrosin, rose bengal, POPE, Giemsa, and Congo red, following their standard protocols. Commercial refrigerated semen doses from four different boars, obtained from a semen processing center, were used. For each staining technique, three slides were prepared from each sample, totaling 12 slides per treatment. The evaluation was performed using light microscopy at 1000× magnification, analyzing 200 spermatozoa per slide. The sperm cells were assessed for possible technical interferences, including staining pattern, artifact formation, agglutination, and difficulties in cell evaluation. The results demonstrated differences in the staining performance of the seminal samples and in the quality of microscopic visualization. Eosin-nigrosin, rose bengal, and POPE provided homogeneous sperm staining, adequate contrast, absence of artifacts, and good definition of cellular structures. Giemsa failed to stain the spermatozoa, whereas Congo red resulted in the formation of an artifact localized in the sperm head region. Although all techniques showed potential for application in porcine sperm analysis, they differed in their efficiency and quality for microscopic evaluation.

Key-words: boar; reproduction; semen; smear staining; sperm analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Suinocultura brasileira e eficiência reprodutiva	7
2.2 Avaliação morfológica espermática em suínos	7
2.3 Propriedades dos corantes	8
2.3.1 Eosina-Nigrosina.....	8
2.3.2 Rosa Bengala	8
2.3.3 POPE (Rase Bengal-Fast Green).....	9
2.3.4 Cerovsky (Vermelho Congo).....	9
2.3.5 Giemsa	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Descrição experimental	10
3.2 Material Biológico.....	10
3.3 Preparo das lâminas e coloração.....	10
3.3.1 Eosina-Nigrosina.....	10
3.3.2 Rosa Bengala	11
3.3.3 POPE.....	11
3.3.4 Vermelho Congo (Método de Cerovsky).....	11
3.3.5 Giemsa	11
3.4 Avaliação microscópica	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Eosina-Nigrosina	12
4.2 Rosa Bengala	12
4.3 POPE	13
4.4 Vermelho Congo	13
4.5 Giemsa	14
4.6 Análise comparativa final	15
5. CONCLUSÃO.....	15
REFERÊNCIAS.....	16

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura ocupa posição de destaque no cenário do agronegócio brasileiro, sendo responsável por expressiva participação na produção e exportação de carne suína. Em sistemas intensivos de produção, a eficiência reprodutiva exerce impacto direto sobre a produtividade e a rentabilidade das granjas (ABPA, 2026)

Nesse contexto, a inseminação artificial é amplamente utilizada como ferramenta de disseminação genética e otimização reprodutiva em suínos. O sucesso dessa biotécnica depende diretamente da qualidade seminal dos reprodutores, a qual é avaliada por meio de parâmetros físicos e morfológicos, incluindo motilidade, concentração, viabilidade e morfologia espermática. Entre esses, a análise morfológica dos espermatozoides é considerada um dos principais indicadores da qualidade do ejaculado, pois permite a identificação de alterações estruturais associadas à redução do potencial fecundante (García-Vázquez et al., 2016; Celeghini et al., 2017).

A morfologia espermática envolve a avaliação detalhada das estruturas celulares, como cabeça, acrossoma, peça intermediária e cauda, sendo essencial para a identificação de defeitos espermáticos que podem comprometer a funcionalidade do gameta masculino. A precisão dessa avaliação depende, entretanto, da qualidade da visualização microscópica, que é diretamente influenciada pelos métodos de coloração empregados (Czubaszek et al., 2019).

Cada método apresenta variação quanto ao princípio de coloração, afinidade pelos componentes celulares e capacidade de evidenciar estruturas específicas dos espermatozoides. Estudos demonstram que tais diferenças podem influenciar significativamente a interpretação morfológica e morfométrica das células, afetando a confiabilidade dos resultados obtidos (Czubaszek et al., 2019; Braune et al., 2025). Nos sêmen de suíno, a aplicação dessas técnicas pode se associar a limitações como, coloração excessiva de citoplasma, formação de artefatos, precipitados, aglutinações e dificuldade de distinção entre estruturas celulares normais e alterações morfológicas reais. Esses fatores podem comprometer a qualidade da análise microscópica e reduzir a reprodutibilidade dos resultados entre diferentes laboratórios (Braune et al., 2025).

Outro aspecto relevante é que muitos protocolos utilizados na rotina laboratorial foram originalmente desenvolvidos para outras espécies, sendo posteriormente adaptados para suínos. Essa adaptação pode não considerar plenamente as particularidades morfológicas e bioquímicas dos espermatozoides suínos, o que contribui para variações inter laboratoriais e reforça a necessidade de padronização metodológica (Rodriguez-Martinez, 2010; Czubaszek et al. 2019)

Diante disso, objetivou-se nesse estudo avaliar e comparar os diferentes métodos de coloração na análise morfológica de espermatozoides de suínos, com foco na qualidade da visualização estrutural e na identificação de interferências técnicas, visando uma maior qualidade visual das colorações na avaliação seminal para a espécie suína.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUINOCULTURA BRASILEIRA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

A suinocultura brasileira ocupa posição de destaque no cenário mundial, figurando entre os principais produtores e exportadores de carne suína. O avanço tecnológico empregado nos sistemas intensivos de produção, junto com as biotécnicas reprodutivas, contribui para o aumento da produtividade do setor (ABPA,2026).

Nesse contexto, a inseminação artificial consolidou-se como uma das principais biotécnicas reprodutivas utilizadas nas granjas comerciais, permitindo uma maior disseminação de material genético superior, redução de custos com manutenção de reprodutores e maior padronização dos plantéis. Porém, a eficiência da técnica se relaciona à qualidade das doses inseminantes, tornando indispensável o controle rigoroso dos parâmetros seminais durante todo o processo de produção, armazenamento e utilização do sêmen (Maside et al., 2023).

Nesse cenário, a avaliação da qualidade seminal representa, portanto, uma etapa fundamental nos programas de reprodução suína, uma vez que alterações podem comprometer o potencial fecundante e impactar negativamente os índices reprodutivos. Nesse sentido, o monitoramento laboratorial do sêmen é parte importante para o controle de qualidade de centrais de inseminação artificial, contribuindo para melhores resultados nas doses inseminantes e em programas reprodutivos (Rocha et al., 2024).

2.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA ESPERMÁTICA EM SUÍNOS

A avaliação morfológica dos espermatozoides é etapa fundamental na análise seminal, utilizada para identificar as alterações estruturais que se associam ao potencial reprodutivo dos machos (García-Vázquez et al.,2016). A avaliação morfológica consiste em observar, detalhadamente, as estruturas espermáticas, como cabeça, acrossoma, peça intermediária e cauda. Essa avaliação permite identificar defeitos estruturais espermáticos, os quais são classificados de acordo com origem e localização (Arruda et al., 2011).

A confiabilidade da avaliação morfológica depende diretamente da qualidade de preparação das amostras e a visualização microscópica das estruturas celulares (Braune et al., 2025). Além disso, diferentes métodos de coloração podem ser empregados, tendo distintos objetivos de

visualização. Com isso, os resultados podem sofrer diferentes interpretações (Braune et al., 2025).

2.3 PROPRIEDADES DOS CORANTES

A avaliação morfológica espermática depende da utilização de técnicas de coloração que facilitam a visualização detalhada da estrutura celular que não pode ser observada em microscopia óptica sem coloração (WHO, 2021). Esses métodos baseiam-se em diferentes interações físico-químicas entre corante e componente celular, possibilitando a diferenciação de estruturas como cabeça, peça intermediária, cauda e acrossoma (Bancroft e Gamble, 2013). As variações entre os protocolos de coloração estão relacionadas à natureza química dos corantes, ao tipo de fixação e à afinidade diferencial pelas estruturas celulares, podendo influenciar a interpretação morfológica dos espermatozoides (WHO, 2021)

2.3.1 Eosina-Nigrosina

A técnica de eosina-nigrosina baseia-se na avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, sendo amplamente utilizada para determinação da viabilidade celular (WHO, 2021). O princípio da técnica está relacionado a permeabilidade seletiva da membrana, de modo que as células com membrana íntegra impedem a penetração da eosina, enquanto células com membrana danificada permitem sua entrada, adquirindo coloração rósea ou avermelhada (Bjorndahl et al., 2003). A nigrosina atua como corante de fundo, dando contraste negativo e facilitando a visualização do contorno celular (WHO, 2021).

2.3.2 Rosa Bengala

O corante rosa bengala é um reagente aniônico ácido amplamente utilizado em exames andrológicos para avaliar a integridade estrutural dos espermatozoides de diversas espécies. É um corante penetrativo que atua tingindo as membranas espermáticas após a fixação das células. Ele confere aos espermatozoides uma cor rosa, destacando o contorno de estruturas que seriam translúcidas em microscopia comum (Vásquez et al., 2012). Sua função é permitir uma visualização detalhada da cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozoide. Dentre os corantes utilizados na rotina laboratorial, ele demonstra ser uma das opções mais econômicas e de grande estabilidade, mantendo a qualidade e a clareza morfológica por longos períodos, o que é ideal para reavaliações diagnósticas e controle de qualidade das lâminas.

2.3.3 POPE (Rose Bengal-Fast Green)

Diferentes de métodos complexos ou dicromáticos, o POPE é descrito como um método de coloração simples, que facilita sua aplicação em rotinas laboratoriais. Sua utilização é fundamentada pela afinidade em corar e identificar estruturas da região acrossomal da cabeça do espermatozoide, sendo uma técnica de avaliação da integridade acrossomal. Quando íntegro, o acrossoma assume uma cor lilás. Já quando lesado, assume uma coloração rosa. O estado do acrossoma é um indicador crítico da fertilidade, uma vez que lesado, dificulta a penetração do oócito (Pope et al; 1991)

2.3.4 Cerovsky (vermelho congo)

O vermelho Congo é um corante aniônico utilizado principalmente em técnicas histológicas e citológicas, apresentando afinidade por estruturas celulares ricas em proteínas. Em microscopia óptica, pode ser utilizado para aumentar o contraste de preparações celulares, contribuindo para a visualização de estruturas morfológicas em amostras biológicas (Bancroft e Gamble, 2013).

Em protocolos experimentais de coloração combinada, o vermelho Congo pode ser associado a corantes básicos, como a violeta genciana, formando sistemas de contraste diferencial baseados na interação entre corantes de natureza ácida e básica. Essa combinação permite a diferenciação de componentes celulares com base em afinidade tintorial, favorecendo a visualização morfológica sob microscopia de luz (Survana et al, 2013).

2.3.5 Giemsa

Na análise de sêmen, a coloração com Giemsa é aplicada principalmente para o estudo do acrossoma (Morani et al. 2018). A coloração se baseia na interação entre componentes ácidos e básicos presentes no corante para gerar contraste entre o núcleo e o citoplasma, juntamente com o uso do metanol para fixação da coloração (Bancroft e Gamble, 2008). Devido a sua capacidade de corar estruturas proteicas e membranas, o giemsa é considerado método padrão para avaliar a integridade acrossomal em diversas espécies, como touros e búfalos (Morani et al., 2018). Assim, espermatozoides corados pelo giemsa, assumem uma tonalidade azul-púrpura escura, embora a peça intermediária e a cauda possam não ser tão visíveis quanto em outros métodos de coloração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

O presente estudo é uma análise experimental descritiva e comparativa, com objeto de avaliar o desempenho de cinco diferentes técnicas de coloração em espermatozoides de suínos. Foram comparadas cinco técnicas de coloração: eosina-nigrosina, rosa bengala, POPE, vermelho congo e Giemsa. Foi avaliada se haveria a ocorrência de falhas na coloração e formação de artefatos que poderiam atrapalhar a visualização das estruturas.

Para cada técnica foram preparadas três lâminas, da mesma dose, dos quatro ejaculados. As lâminas foram confeccionadas todas no mesmo dia e análise em dias posteriores. A análise constituiu na observação de 200 espermatozoides por lâmina. Os critérios de avaliação foram focados na coloração e presença de artefatos ou precipitados que poderiam interferir na interpretação das lâminas.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas doses refrigeradas de sêmen provenientes de uma central comercial de suínos (Agroceres PIC) de quatro reprodutores diferentes que foram doadas pela granja Ipê, localizada no município de Uberlândia-MG. A utilização de doses de diferentes machos visou garantir a variabilidade biológica necessária para testar a eficiência das técnicas de coloração em diferentes amostras. As amostras foram utilizadas na confecção de três lâminas por técnica de coloração, totalizando o suporte necessário para a avaliação microscópica comparativa

3.3 PREPARO DAS LÂMINAS E COLORAÇÃO

As lâminas foram preparadas conforme protocolos de rotina laboratorial e procedimentos descritos na literatura para cada técnica de coloração, com adaptações necessárias à padronização experimental do estudo. Todos os protocolos estão descritos em Pope et al. (1991) e Morani et al. (2018).

3.3.1 Eosina-Nigrosina

A coloração com eosina-nigrosina foi realizada pela metodologia descrita no manual de reprodução de animais domésticos, em método Hancock (Morani et al; 2018). Para realizar a lâmina, foi feito o esfregaço com a mesma porção de sêmen e solução eosina-nigrosina, depois disso foi deixado secar ao ar. Após secagem, foi realizada a leitura.

3.3.2 Rosa Bengala

A coloração com rosa bengala foi realizada por meio da deposição de uma gota de sêmen e uma gota do corante em lâmina de vidro, seguida de homogeneização imediata (Morani et al; 2018). Em seguida, foi realizado esfregão da amostra, com secagem em ambiente e posterior observação.

3.3.3 POPE

A técnica com POPE foi realizada pela deposição de uma gota de sêmen e uma gota do corante em lâmina de vidro, seguida de homogeneização imediata (Pope et al; 1991). Após isso, foi realizado esfregão, secagem em ambiente e observação microscópica.

3.3.4 Vermelho Congo (Método de Cerovsky)

A coloração com vermelho congo foi realizada por meio de esfregão seminal em lâmina de vidro, seguido de secagem em ambiente. Em seguida, a lâmina foi imersa em solução de corante vermelho congo por 1 minuto e 30 segundos, lavada com água destilada e novamente seca em ambiente. Posteriormente, a lâmina foi imersa em solução de violeta genciana por 1 minuto, sendo novamente lavada com água destilada e seca em ambiente para análise (Morani et al; 2018).

3.3.5 Giemsa

A solução de Giemsa foi preparada em laboratório utilizando: 0,75 g de corante Giemsa, 50 ml de glicerina e 50 ml de metanol. A mistura foi submetida a banho-maria por uma hora, seguida da posterior adição do metanol. Para finalizar, a solução foi armazenada em frasco escuro e mantida em repouso por 10 dias para maturação.

Para a coloração, foi realizado esfregão seminal em lâmina de vidro, seguido de secagem ao ar ambiente. Em seguida, a lâmina foi imersa na solução de Giemsa por 2 horas, sendo posteriormente lavada com água destilada e seca em ambiente, seguida da avaliação.

3.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica no aumento 1000x, sob imersão em. Em cada lâmina foram avaliados 200 espermatozoides. As lâminas foram avaliadas

qualitativamente quanto à eficiência da coloração para visualização espermática, considerando: qualidade da coloração e presença de artefatos, excesso de pigmentação ou falhas de coloração

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EOSINA-NIGROSINA

Os resultados obtidos apresentaram homogeneidade e alto contraste, facilitando a distinção entre células com membranas íntegras e lesionadas (Figura 1).

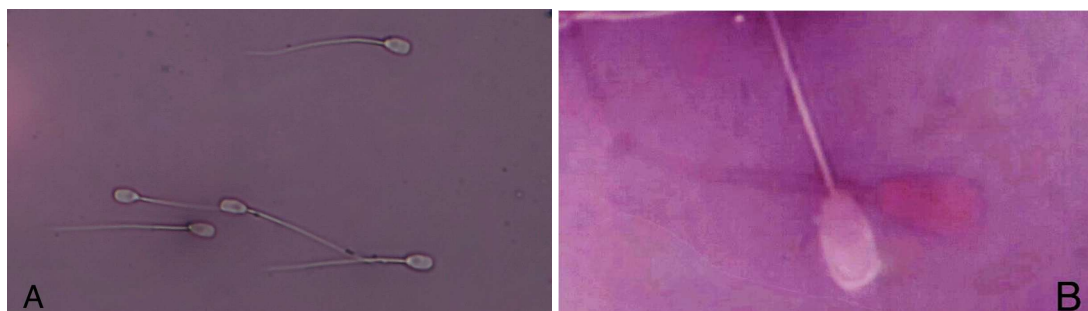


Figura 1: Microfotografias de espermatozoides suínos, coloração de eosina/nigrosina, sendo espermatozoides com membrana íntegra (não corados) e espermatozoides com membrana lesionada (corados). Aumento de 400x (A); Aumento de 1000x (B).

A ausência de artefatos observados neste estudo corrobora com os achados de Braune et al. (2025), que classificam a técnica como eficaz para a rotina de centrais. Embora estes autores apontem a formação de cristais de corante após armazenamento prolongado, o fato de a análise ter sido imediata evitou a interferência nas amostras avaliadas.

4.2 ROSA BENGALA

A técnica apresentou ótima visualização estrutural, destacando contornos que seriam translúcidos em microscopia comum (Figura 2). No sêmen suíno, o corante atua como um corante penetrativo estável, como afirmado por Braune et al. (2025).

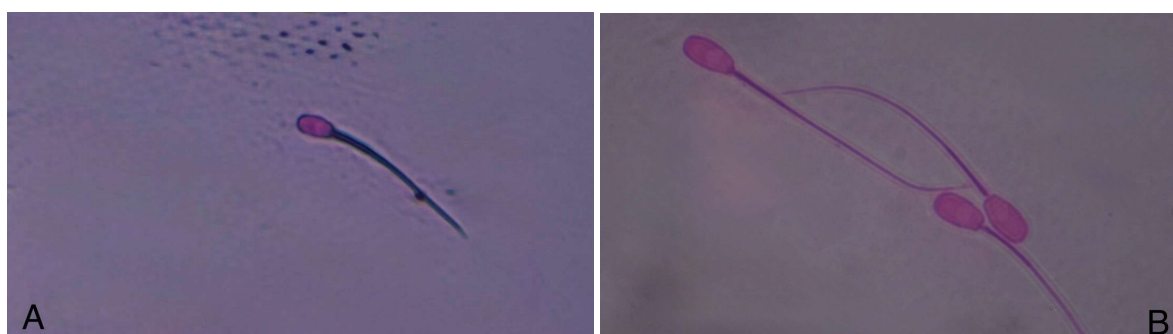


Figura 2: Microfotografias de espermatozoides suínos, coloração com rosa bengala. Aumento de 400x (A); Aumento de 1000x.

Apesar dos poucos relatos de literatura específica, Braune et al. (2025) realizaram uma avaliação detalhada desta técnica em suínos, atribuindo-lhe notas máximas (5/5) para intensidade de cor, clareza visual e contraste. No entanto, um ponto crítico de discussão reside na formação de artefatos: enquanto este estudo não demonstrou falhas na coloração, Braune et al. (2025) relataram que o corante apresentou uma maior proporção de espermatozoides com cabeças lanceoladas (7,97%), um efeito decorrente da dessecação durante o preparo do esfregaço.

4.3 POPE

A técnica de POPE mostrou-se eficiente na identificação das estruturas da região acrossomal, apresentando um bom contraste na cor lilás nos acrossomas íntegros (Figura 3).

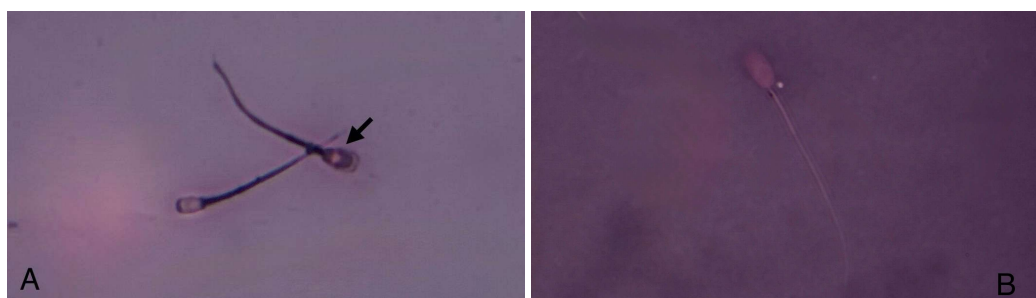


Figura 3: Microfotografias de espermatozoides suínos, coloração de POPE. Aumento de 400x (A); Aumento de 1000x (B).

Embora tenha sido originalmente desenvolvido por Pope et al. (1991) para felinos, os resultados deste estudo confirmam sua plena aplicabilidade na espécie suína, mantendo um visual claro sem precipitados. A simplicidade do método favorece sua adoção em rotinas que exigem agilidade e solução na avaliação do acrossoma

4.4 VERMELHO CONGO

A técnica de vermelho congo associada ao corante violeta genciana apresentou boa coloração das amostras. Entretanto, analisando a imagem das células, houve em todos os espermatozoides um halo róseo separado da região anterior da cabeça, dando a impressão de que o acrossoma está "descolado" ou “desprendido” (Figura 4).

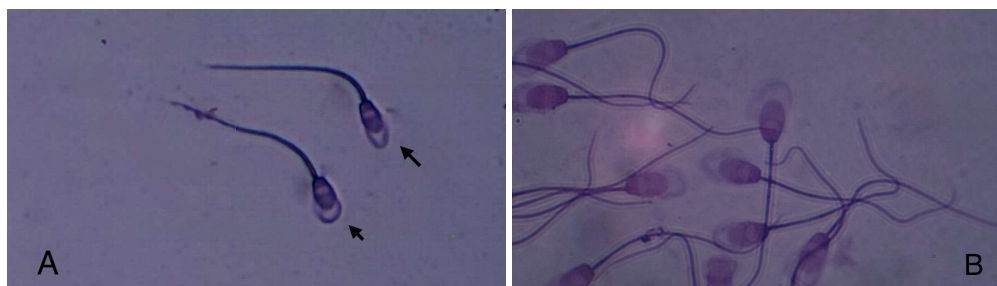


Figura 4: Microfotografias de espermatozoides suínos, coloração com Vermelho congo (Cerovski); (A) aumento de 400x, evidenciando detalhe da região acrossomal (setas); (B) Aumento de 1000x.

Comparando diferentes técnicas e protocolos de coloração demonstraram que eles podem produzir artefatos, depósitos de corante e aumento artificial da frequência de alterações morfológicas, interferindo na avaliação espermática (Braune et al., 2025). Dessa forma, considerando que o aparente “desprendimento” do acrossoma foi observado exclusivamente nesta coloração e de forma homogênea em praticamente todas as células, conclui-se que esse achado representa um artefato técnico, não refletindo uma alteração morfológica real dos espermatozoides analisados.

4.5 GIEMSA

Diferentemente do esperado pela literatura clássica, com exemplo de Watson et al. (1975), que posiciona o Giemsa como padrão para avaliação nuclear e acrossomal em outras espécies como touros, a técnica não promoveu a coloração nas amostras suínas deste estudo (Figura 5).



Figura 5: Microfotografias de espermatozoides suínos, coloração com Giemsa. Aumento de 400x (A); Aumento de 1000x (B).

Essa falha pode estar relacionada à complexidade do preparo e ao longo tempo de maturação exigido, como outros fatores envolvendo pH, concentração e fixação. Além disso, estudos comparativos recentes de Braune et al. (2025) indicaram que o Giemsa e seus análogos

apresentam baixo contraste natural na espécie suína, o que reforça a necessidade de protocolos mais específicos para este grupo.

4.6 ANÁLISE COMPARATIVA FINAL

A comparação entre as técnicas de coloração evidenciou diferenças quanto ao desempenho na coloração das amostras seminais e na qualidade da visualização microscópica. As técnicas de eosina-nigrosina, rosa bengala e POPE apresentaram coloração homogênea dos espermatozoides, proporcionando adequado contraste e boa definição das estruturas celulares, sem ocorrência de artefatos que comprometessem a interpretação microscópica. Em contrapartida, a técnica de Giemsa não promoveu a coloração dos espermatozoides nas condições empregadas neste estudo, impossibilitando a adequada visualização das estruturas celulares. Já a técnica do vermelho congo resultou na formação de um artefato localizado na região da cabeça dos espermatozoides, dificultando a interpretação da coloração nessa porção da célula.

Esses resultados demonstram que, embora a maioria das técnicas possuam potencial de aplicação em análises espermáticas dos suínos, diferenças relacionadas à eficiência da coloração e à ocorrência de artefatos podem influenciar diretamente a qualidade da avaliação microscópica.

5. CONCLUSÃO

Com isso fica evidente a realização de uma padronização, quanto a realização das técnicas de coloração utilizado na avaliação morfológica em sêmen suínos. Vale ressaltar que, o presente estudo também mostra há necessidade de novos estudos para avaliar o desempenho de outras técnicas reprodutíveis e viáveis em centrais de processamento de sêmen suíno.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; et al. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). *Relatório Anual 2026*. São Paulo: ABPA, 2026.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2008. 725 p.

BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. **Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment**. *Human Reproduction*, v. 18, n. 4, p. 813-816, 2003.

BRAUNE, A.; MÜLLER, K.; KNOX, R. V.; et al. **Comparison of staining techniques for boar sperm morphology evaluation**. *Animals*, Basel, v. 15, 2025.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; SANTOS, F. B.; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017.

CZUBASZEK, M.; ANDRASZEK, K.; BANASZEWSKA, D.; WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R. **The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm**. *PLoS ONE*, v. 14, n. 3, e0214243, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0214243.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; GADEA, J.; MATÁS, C.; HOLT, W. V. **Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals**. *Asian Journal of Andrology*, v. 18, n. 6, p. 844-850, 2016.

MASIDE, C.; RECUERO, S.; SALAS-HUETOS, A.; RIBAS-MAYNOU, J.; YESTE, M. **Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab**. *Animal*, v. 17, n. 3, e100720, 2023.

MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; RONCOLETTA, M. **Manual de reprodução nas espécies domésticas: avaliação e empregabilidade do sêmen.** v. 1. São Paulo: MedVet, 2018. 232 p.

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, n. 1, p. 87-95, 1991.

ROCHA, J. C.; ROSA, E. R.; QUIRINO, M.; MARQUES, M. G.; BENNEMANN, P. E.; COLDEBELLA, A.; RAUBER, L. P.; SCHWEGLER, E.; MOREIRA, F.; PERIPOLLI, V.; LUCIA JUNIOR, T.; BIANCHI, I. **Quality control of semen processing in boar studs: a Brazilian scenario.** *Scientia Agricola*, v. 81, e20230164, 2024.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; WALLGREN, M. **Advances in boar semen cryopreservation.** *Veterinary Medicine International*, v. 2010, Article ID 396181, 2010.

SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. **Bancroft's theory and practice of histological techniques.** 7. ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier, 2013.

VÁSQUEZ, J. M.; et al. **Comparación de dos diferentes metodologías de evaluación de la morfología del semen porcino.** *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 44, n. 2, p. 173-177, 2012.

WATSON, P. F. **Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa.** *Veterinary Record*, v. 97, n. 1, p. 12-15, 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 6. ed. Geneva: World Health Organization, 2021.