Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação — REASE

OPEN ACCESS

doi.org/10.51891/rease.v12i11.31981

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE COLORAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE CÃES (Canis familiaris)

EVALUATION OF STAINING METHODS FOR CANINE SPERM MORPHOLOGY (CANIS FAMILIARIS)

EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TINCIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA CANINA (CANIS FAMILIARIS)

Lívia Roxinol Costa[1]
Daniela Mello Vianna Ferrer[2]
Eliene Porto Sad Pina[3]
Marina Jorge de Lemos[4]
Dala Kezen Vieira Hardman Leite[5]

RESUMO: A avaliação da qualidade seminal permite estimar a capacidade reprodutiva de cães, sendo a morfologia espermática importante para identificar alterações que comprometem o potencial reprodutivo. Este estudo objetivou avaliar diferentes métodos de coloração da morfologia espermática canina. Foram utilizados cinco cães machos, sem raça definida, com idades entre um e sete anos, submetidos a exame andrológico completo. As amostras seminais foram coradas com Panótico Rápido, Giemsa, Azul de Metileno, Rosa Bengala e Vermelho Congo. Avaliaram-se 200 espermatozoides por animal em cada método, utilizando delineamento em blocos casualizados, considerando cada cão como bloco. Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey, com significância de 5%. Dois cães (40%) apresentaram alterações cutâneas escrotais, sem alterações nos demais órgãos reprodutivos. O volume ejaculado variou de 1 a 3 mL, a motilidade de 20% a 95% e o vigor de 4 a 5. Houve diferenças significativas entre os métodos ($p < 0,05$) nos percentuais de espermatozoides normais e de defeitos maiores, menores e totais, com percentuais de espermatozoides normais entre 46% e 71%, sem padrão uniforme entre os cães. O Panótico Rápido favoreceu a avaliação da cabeça; Giemsa e Vermelho Congo evidenciaram a peça intermediária e a cauda; Rosa Bengala permitiu boa visualização nuclear; e Azul de Metileno apresentou menor contraste na cabeça. Conclui-se que a coloração influencia a visualização espermática e a identificação de defeitos morfológicos em cães.

Palavras-chave: Corantes. Sêmen. Canino.

[1] Acadêmica de Medicina Veterinária. Universidade Iguaçu (UNIG), Campus Nova Iguaçu.
[2] Doutora em Ciências (UFRRJ). Graduada pela UFF. Professora da UNIG e Professora Titular da UNFESO.
[3] Coorientadora. Doutora em Ciência Animal (UFRRJ). Universidade Iguaçu (UNIG).
[4] Doutora em Ciência Animal. Docente de Medicina Veterinária da Universidade Iguaçu (UNIG).
[5] Doutora em Patologia (Universidade Federal Fluminense – UFF). Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Iguaçu (UNIG).

ABSTRACT: Semen quality assessment helps estimate the reproductive capacity of dogs, and sperm morphology is important for identifying abnormalities that may compromise reproductive potential. This study aimed to evaluate different staining methods for assessing canine sperm morphology. Five mixed-breed male dogs, aged one to seven years, underwent complete andrological examinations. Seminal samples were stained using Panoptic Rapid, Giemsa, Methylene Blue, Rose Bengal, and Congo Red. Two hundred spermatozoa per animal were evaluated for each staining method, using a randomized block design, with each dog considered a block. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, with a significance level of 5%. Two dogs (40%) presented scrotal skin abnormalities, with no changes in the other reproductive organs. Ejaculate volume ranged from 1 to 3 mL, motility from 20% to 95%, and vigor scores from 4 to 5. Significant differences among staining methods ($p < 0.05$) were observed in the percentages of normal spermatozoa and major, minor, and total defects. The percentage of normal spermatozoa ranged from 46% to 71%, with no consistent pattern among dogs. Panoptic Rapid staining enhanced head shape assessment; Giemsa and Congo Red highlighted the midpiece and tail; Rose Bengal provided good visualization of the nucleus; and Methylene Blue showed lower contrast in the head region. It is concluded that staining methods influence the visualization of sperm structures and the identification of morphological defects in dogs.

Keywords: Stains. Semen. Canine.

RESUMEN: La evaluación de la calidad seminal permite estimar la capacidad reproductiva de los perros, y la morfología espermática es importante para identificar alteraciones que puedan comprometer el potencial reproductivo. Este estudio tuvo como objetivo evaluar diferentes métodos de tinción para el análisis de la morfología espermática canina. Se utilizaron cinco perros machos mestizos, de uno a siete años, sometidos a un examen andrológico completo. Las muestras seminales se tiñeron con Panótico Rápido, Giemsa, Azul de Metileno, Rosa de Bengala y Rojo Congo. Se evaluaron 200 espermatozoides por animal para cada método, mediante un diseño de bloques al azar, considerando cada perro como bloque. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de Tukey, con un nivel de significación del 5 %. Dos perros (40 %) presentaron alteraciones cutáneas escrotales, sin cambios en los demás órganos reproductivos. El volumen del eyaculado varió de 1 a 3 mL, la motilidad del 20 % al 95 % y el vigor de 4 a 5. Se observaron diferencias significativas entre los métodos ($p < 0,05$) en los porcentajes de espermatozoides normales y de defectos mayores, menores y totales. El porcentaje de espermatozoides normales osciló entre el 46 % y el 71 %, sin un patrón uniforme entre los perros. El Panótico Rápido favoreció la evaluación de la cabeza; Giemsa y Rojo Congo destacaron la pieza intermedia y la cola; Rosa de Bengala permitió una buena visualización del núcleo; y Azul de Metileno presentó menor contraste en la cabeza. Se concluye que el método de tinción influye en la visualización de las estructuras espermáticas y en la identificación de defectos morfológicos en perros.

Palabras clave: Tinciones. Semen. Canino.

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelas diferentes raças caninas e por suas características fenotípicas e genéticas tem estimulado a busca pela preservação de animais com elevado valor genético e zootécnico, adequados aos mais diversos estilos de vida e objetivos de criação (Ostrander *et al.*, 2017; Verbeek *et al.*, 2024).

A reprodução canina tem ganhado relevância tanto na pesquisa científica quanto na prática clínica, tornando necessária a utilização de métodos diagnósticos capazes de avaliar a capacidade reprodutiva dos machos e identificar alterações que possam comprometer a

fertilidade (Arlt *et al.*, 2023; Domrazek *et al.*, 2024; Donato *et al.*, 2026). A seleção de cães destinados à reprodução depende da avaliação da produção e da qualidade do sêmen, e o exame andrológico é essencial para identificar alterações reprodutivas e auxiliar na escolha de reprodutores, inclusive após enfermidades ou tratamentos medicamentosos (Apparício; Vicente, 2015; Mothé *et al.*, 2024; Brito; Silva; Kolster, 2025).

Entre os parâmetros utilizados na avaliação seminal, a análise morfológica dos espermatozoides destaca-se por permitir avaliar a integridade estrutural das células e identificar alterações relacionadas à espermatogênese, à maturação e ao transporte espermático. Dessa forma, essa análise fornece informações relevantes sobre a qualidade seminal e o potencial reprodutivo dos cães (Dahlbom *et al.*, 1997; CBRA, 2013; Kolster, 2018; Tesi *et al.*, 2018; Wysokińska, 2022; Costa *et al.*, 2025).

Além dos parâmetros seminais, a avaliação andrológica deve considerar as características individuais e as condições clínicas do animal, uma vez que esses fatores auxiliam na interpretação dos resultados e na identificação de possíveis alterações reprodutivas (Silva *et al.*, 2025). A avaliação da qualidade seminal em cães deve considerar fatores individuais e clínicos que podem influenciar os parâmetros reprodutivos. O volume do ejaculado, por exemplo, está relacionado à composição das diferentes frações seminais e à quantidade de fluido prostático coletado, não representando isoladamente um indicador da qualidade espermática. Além disso, características como idade e porte corporal podem estar associadas a variações em determinados parâmetros seminais, reforçando a importância de interpretar os resultados de forma integrada. O exame clínico do sistema reprodutor também deve considerar a integridade da região genital e as condições testiculares, incluindo a termorregulação, dada sua relevância para a função reprodutiva (Trenti *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2023; Jasmim *et al.*, 2024).

Na espécie canina, os defeitos morfológicos podem comprometer a fertilidade e são classificados em maiores e menores, conforme suas características e seu potencial impacto reprodutivo. Entre as alterações observadas, destacam-se os defeitos de cabeça, como formatos anormais e presença de vacúolos, além de alterações na peça intermediária e na cauda. A identificação e a classificação dessas anormalidades são fundamentais para a interpretação da qualidade seminal e para a estimativa do potencial da fertilidade dos animais (Monteiro *et al.*, 2020; Brito; Silva; Kolster, 2025; Urli *et al.*, 2025).

A qualidade seminal dos cães está relacionada a diferentes fatores fisiológicos e individuais, entre os quais se destacam a idade e a raça, que podem influenciar as características

morfológicas e morfométricas dos espermatozoides. Essas características constituem aspectos importantes na avaliação da função reprodutiva dos machos, pois contribuem para a compreensão da qualidade espermática e da variabilidade observada entre os animais (Soler *et al.*, 2017; Bhanmeechao *et al.*, 2018; Tesi *et al.*, 2018; Cavalcanti *et al.*, 2020; Christensen; Meyers, 2023).

Para a identificação adequada dessas alterações, as técnicas de coloração seminal são indispensáveis, pois aumentam o contraste entre as estruturas celulares e facilitam a visualização microscópica dos espermatozoides (Silva *et al.*, 2008; CBRA, 2013; Mazzuchini; Novello; Segabinazzi, 2024). A escolha do corante pode influenciar a observação de estruturas como cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda, contribuindo para a identificação de alterações morfológicas e morfométricas (Çebi Şen *et al.*, 2016; Andrade, 2023; Souza *et al.*, 2023; Jasmim *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2025).

As técnicas de coloração empregadas na avaliação morfológica dos espermatozoides diferem quanto aos seus princípios tintoriais, à afinidade pelos componentes celulares e à capacidade de evidenciar estruturas específicas. Essas diferenças podem modificar o contraste entre as estruturas espermáticas, como a cabeça, o acrossomo, a peça intermediária e a cauda, interferindo na identificação de alterações morfológicas e na mensuração das dimensões celulares (Root Kustritz *et al.*, 1998; Czubaszek *et al.*, 2019; Surmacz *et al.*, 2022).

Determinados métodos podem favorecer a visualização de algumas estruturas, mas apresentar limitações na diferenciação de outras, dificultando a identificação de defeitos específicos. Dessa forma, o tipo de corante constitui um fator relevante para a confiabilidade da análise morfológica, uma vez que a qualidade da visualização depende tanto das características do método empregado quanto do preparo da amostra e da técnica de avaliação (Çebi Şen *et al.*, 2016; Surmacz *et al.*, 2022).

Por outro lado, uma coloração inadequada pode gerar artefatos, dificultar a observação de estruturas celulares finas ou até mesmo mascarar defeitos importantes, comprometendo a acurácia da avaliação (Surmacz *et al.*, 2022). Portanto, a seleção de uma técnica de coloração apropriada não apenas aumenta a qualidade da visualização das estruturas espermáticas, mas também é essencial para a obtenção de resultados mais precisos e reprodutíveis. Resultados confiáveis são fundamentais para decisões clínicas relacionadas ao diagnóstico de alterações reprodutivas, à seleção criteriosa de reprodutores e ao manejo de animais utilizados em programas de reprodução assistida (Brito; Silva; Kolster, 2025).

O objetivo deste estudo visa comparar métodos de coloração na avaliação da morfologia espermática de cães.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com cinco cães machos, sem raça definida, com idades entre um a sete anos, provenientes da Clínica Escola do curso de Medicina Veterinária da Universidade Iguaçu, Campus I – UNIG. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIG, sob o protocolo PEBIO/UNIG Nº 12/2024.

Os cães selecionados foram registrados em fichas individuais contendo histórico reprodutivo e geral, anamnese, avaliação física, inspeção e palpação do sistema reprodutor e espermograma.

Todos os cães foram submetidos a exame andrológico completo. A bolsa escrotal foi avaliada quanto ao tamanho, à forma e à presença de alterações. Por meio de inspeção e palpação, os testículos foram avaliados quanto à presença na bolsa escrotal, à mobilidade e à consistência. Os epidídimos foram avaliados quanto ao tamanho e à conformação, e o prepúcio e o pênis, quanto à morfologia e à presença de secreções.

A colheita de sêmen foi realizada pelo método de manipulação digital do prepúcio e do pênis, com o animal em estação e na presença de uma fêmea em estro. O sêmen foi colhido em três funis acoplados a tubos coletores graduados, sendo fracionado em: primeira fração, aquosa; segunda fração, rica em espermatozoides; e terceira fração, de origem prostática. Somente a segunda fração foi utilizada para as avaliações macroscópica e microscópica imediatas.

A avaliação microscópica do sêmen compreendeu motilidade, vigor e morfologia espermática, realizadas em microscópio óptico por avaliação subjetiva. Para motilidade e vigor, uma gota de sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula previamente limpas e aquecidas a aproximadamente 37 °C e examinada em aumento de 40x.

A motilidade progressiva foi estimada em porcentagem (0 a 100%), considerando a proporção de espermatozoides com movimentação progressiva no campo microscópico, sendo considerada normal a motilidade superior a 60,0%. O vigor foi classificado em escala de 0 a 5, sendo considerado normal o vigor superior a 3 (CBRA, 2013).

Para a análise morfológica espermática, foi confeccionado um esfregaço em lâmina para cada corante, corado por Panótico Rápido, Giemsa, Azul de Metileno, Vermelho Congo e Rosa Bengala.

A coloração por Panótico Rápido foi realizada após a confecção e secagem dos esfregaços, sendo as lâminas submetidas a 30 imersões na solução fixadora, 15 imersões na solução de eosina e 15 imersões na solução de Azul de metileno. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente e deixadas para secar ao ar. Para a coloração por Giemsa, os esfregaços foram fixados em metanol absoluto por 10 minutos e, posteriormente, submetidos à solução diluída de Giemsa por 20 a 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas para secar ao ar.

Na coloração por Azul de Metileno, as lâminas foram fixadas em solução de citrato de sódio e formalina por 5 minutos e, em seguida, imersas na solução de Azul de Metileno por 1 minuto. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e deixadas para secar ao ar. Para a coloração por Vermelho Congo, os esfregaços foram fixados em metanol absoluto por 20 minutos e, posteriormente, corados com solução de vermelho Congo por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas à solução de violeta de genciana por 1 minuto, lavadas delicadamente e deixadas para secar ao ar. Por fim, na coloração por Rosa Bengala, as lâminas foram fixadas em solução de citrato de sódio e formalina a 37% por 5 minutos e, posteriormente, imersas na solução de Rosa Bengala por 1 minuto. Após a coloração, foram lavadas delicadamente em água corrente e deixadas para secar ao ar.

Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina de cada animal, em microscópio óptico, em objetiva de imersão (100x). As alterações morfológicas dos espermatozoides foram classificadas em duas categorias: defeitos maiores, considerados mais graves, e defeitos menores, considerados menos graves. As alterações da morfologia espermática foram classificadas em defeitos maiores, incluindo alterações de cabeça, acrossomo e peça intermediária, gota protoplasmática proximal e cauda fortemente enrolada; e defeitos menores, incluindo gota protoplasmática distal, cauda dobrada ou enrolada, cabeça isolada normal e cabeça gigante, curta, larga ou delgada. Após a contagem, os defeitos foram expressos em percentual. Considerou-se dentro da normalidade o sêmen com percentual igual ou superior a 70,0% de espermatozoides morfologicamente normais, com máximo de 10,0% de defeitos maiores e 20,0% de defeitos menores (CBRA, 2013).

Posteriormente, os dados do histórico, do exame clínico e do espermograma foram associados para a avaliação andrológica dos animais. Complementarmente, a morfologia espermática foi avaliada pelos diferentes métodos de coloração, a fim de comparar sua eficiência

na visualização das estruturas espermáticas e na identificação e classificação dos defeitos morfológicos.

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, no qual cada animal constituiu um bloco (seu próprio controle), e as amostras de cada cão foram avaliadas por todos os métodos de coloração. Para controlar a variação biológica e ambiental, como raça e idade, além de nutrição e sanidade, estes fatores foram integrados ao modelo experimental, isolando o efeito fixo do método analítico.

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos aos testes estatísticos de Shapiro-Wilk e de Levene para verificação da normalidade dos resíduos e da homogeneidade das variâncias, respectivamente. As diferenças entre as médias dos métodos de coloração foram testadas por ANOVA, com graus de liberdade estimados pela aproximação de Satterthwaite. Quando houve efeito significativo ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cinco cães avaliados apresentaram peso corporal entre 4,7 e 40,0 kg, e dois deles (40,0%) apresentaram alterações cutâneas na bolsa escrotal, incluindo cicatrizes, feridas e descamação. Essas alterações merecem alterações merece atenção durante o exame clínico, considerando a suscetibilidade da pele escrotal à dermatite de contato, estando de acordo com Trenti *et al.* (2011) que ao investigarem 13 cães com suspeita de dermatite escrotal de contato, identificaram possíveis agentes desencadeantes, como detergentes, água sanitária, cimento, produtos para lavagem de roupas e tecidos plásticos, reforçando a importância de investigar possíveis exposições ambientais na avaliação dessas lesões. Embora os achados do presente estudo sejam compatíveis com as alterações cutâneas escrotais descritas na literatura, não é possível estabelecer uma relação causal com dermatite de contato, uma vez que não foram realizados testes diagnósticos específicos.

Nos demais animais (60,0%), a bolsa escrotal não apresentou alterações. Os testículos estavam presentes na bolsa escrotal em todos os cães, com mobilidade variando de reduzida a aumentada e consistência de normal a dura. Os epidídimos estavam presentes em todos os animais, com variação de tamanho e consistência de normal a dura. O prepúcio apresentou aspecto normal, e o pênis não apresentou alterações clínicas relevantes nos cães avaliados. Esses achados reforçam a importância da avaliação clínica dos órgãos reprodutores, de acordo com

Souza *et al.* (2024), que ressaltam a relevância da análise dos parâmetros testiculares e seminais para a investigação da fertilidade em cães.

O volume do ejaculado variou de 1 a 3 mL entre os animais avaliados, resultado compatível com os achados de Domrazek *et al.* (2024), que, ao avaliarem 63 cães, observaram volume seminal mediano de 2,5 mL, com variação de 0,4 a 5,0 mL. Os autores também identificaram correlação positiva entre o volume do ejaculado e o peso corporal dos animais, indicando que características individuais, como o porte corporal, podem influenciar esse parâmetro seminal. Quanto aos parâmetros espermáticos, a motilidade apresentou ampla variação entre os animais, de 20 a 95%, enquanto o vigor variou de 4 a 5. Essa variação está relacionada às diferenças individuais entre os animais e reforça a importância da avaliação conjunta dos parâmetros seminais durante o exame andrológico, como destacado por Cavalcanti *et al.* (2020) e Christensen e Meyers (2023).

Os resultados do cão 1 (Tabela 1), apresentaram uma diferença significativa entre os métodos de coloração para todas as características avaliadas. Para espermatozoides normais, os maiores percentuais ($p<0,05$) foram observados com Azul de Metileno (63,5%) e Vermelho Congo (58,5%), que não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$) enquanto os menores valores foram registrados para Panótico Rápido (50,5%), Rosa Bengala (54,0%) e Giemsa (56,5%), onde não foram observadas diferenças significativas entre eles ($p>0,05$). Quanto aos defeitos menores, Giemsa (28,5%) e Vermelho Congo (29,5%) apresentaram os maiores percentuais, diferindo dos demais métodos ($p<0,05$), que apresentaram valores entre 19,0% e 25,0%. Para defeitos maiores, os maiores percentuais foram observados com Rosa Bengala (27,0%) e Panótico Rápido (24,5%), enquanto Giemsa, Azul de Metileno e Vermelho Congo apresentaram menores valores. Em relação ao total de defeitos, Panótico Rápido (49,5%), Vermelho Congo (41,5%), Rosa Bengala (46,0%) e Giemsa (43,5%) apresentaram os maiores percentuais, não diferiram entre si ($p>0,05$), enquanto Azul de Metileno apresentou o menor valor (36,5%). Os métodos de coloração na avaliação espermática influenciam na observação e a interpretação das estruturas celulares de acordo com os autores Surmacz *et al.* (2022) que descreveram que os diferentes métodos de coloração influenciam as dimensões morfométricas dos espermatozoides provenientes do epidídimo de cães, evidenciando que a técnica empregada pode interferir nas características celulares observadas ao microscópio.

Tabela 1 – Percentual de espermatozoides normais e com defeitos morfológicos no cão 1, de acordo com o método de coloração

Cão 1	SPTZ Normais	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Total de defeitos
Panótico Rápido	50,5%	25,0%	24,5%	49,5%
Giemsa	56,5%	28,5%	15,0%	43,5%
Azul de Metileno	63,5%	25,0%	11,5%	36,5%
Rosa Bengala	54,0%	19,0%	27,0%	46,0%
Vermelho Congo	58,5%	29,5%	12,0%	41,5%
CV %	5,21	8,14	7,56	5,18

Nota. CV - coeficiente de variação. Dados seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Os resultados referentes ao cão 2 (Tabela 2), evidencia diferenças significativas entre os métodos de coloração para todas as características avaliadas. Para espermatozoides normais, os maiores percentuais foram observados com Giemsa (61,5%) e Rosa Bengala (60,0%), sem diferença significativa entre si (p > 0,05), mas superiores aos valores obtidos com Panótico Rápido (55,0%), Azul de Metileno (54,0%) e Vermelho Congo (52,5%), que também não diferiram significativamente entre si (p > 0,05). Essas variações estão relacionadas com a técnica de coloração na visualização e identificação das estruturas espermáticas, em concordância com Root Kustritz *et al.* (1998), no qual descreve que a proporção de espermatozoides caninos classificados como morfologicamente normais pode variar conforme o método de coloração empregado. Em relação aos defeitos menores, o maior percentual foi observado com Vermelho Congo (38,0%), seguido por Panótico Rápido (34,0%), Azul de Metileno (32,0%) e Giemsa (31,0%), que não diferiram significativamente entre si (p > 0,05). O menor percentual foi registrado com Rosa Bengala (26,5%), que diferiu significativamente dos demais métodos (p < 0,05). Para defeitos maiores, Azul de Metileno (14,0%), Rosa Bengala (13,5%) e Panótico Rápido (11,0%) apresentaram os maiores percentuais, sem diferenças significativas entre si (p > 0,05). Em contrapartida, Giemsa (7,5%) e Vermelho Congo (9,5%) apresentaram os menores valores, também sem diferença significativa entre si (p > 0,05), mas diferindo significativamente dos métodos com maiores percentuais (p < 0,05). Em relação ao total de defeitos, os maiores percentuais foram observados com Vermelho Congo (47,5%), Azul de Metileno (46,0%) e Panótico Rápido (45,0%), que não diferiram significativamente entre si (p > 0,05), enquanto, Giemsa (38,5%) e Rosa Bengala (40,0%) apresentaram os menores percentuais, sem diferença significativa entre si (p > 0,05), mas diferindo significativamente dos demais métodos (p < 0,05).

Tabela 2 – Percentual de espermatozoides normais e com defeitos morfológicos no cão 2, de acordo com o método de coloração

Cão 2	Normais	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Total de defeitos
Panótico Rápido	55,0%	34,0%	11,0%	45,0%
Giemsa	61,5%	31,0%	7,5%	38,5%
Azul de Metileno	54,0%	32,0%	14,0%	46,0%
Rosa Bengala	60,0%	26,5%	13,5%	40,0%
Vermelho Congo	52,5%	38,0%	9,5%	47,5%
CV %	6,88	4,84	5,64	5,31

Nota. CV - coeficiente de variação. Dados seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Os resultados obtidos para o cão 3 (Tabela 3), demonstram diferenças significativas entre os métodos de coloração para as características avaliadas. Para espermatozoides normais, o maior percentual foi observado com Giemsa (64,0%), que diferiu significativamente dos métodos Panótico Rápido (60,5%), Azul de Metileno (56,5%) e Rosa Bengala (60,0%), os quais não diferiram significativamente entre si (p > 0,05). Vermelho Congo apresentou o menor percentual (46,0%), diferindo significativamente dos demais métodos (p < 0,05). Quanto aos defeitos menores, Panótico Rápido (29,5%) e Azul de Metileno (26,5%) apresentaram os menores valores, sem diferença significativa entre si (p > 0,05), enquanto Giemsa (31,0%), Rosa Bengala (31,5%) e Vermelho Congo (38,0%) apresentaram valores superiores, sem diferença significativa entre si (p > 0,05). Em relação aos defeitos maiores, os maiores percentuais foram observados com Azul de Metileno (17,0%) e Vermelho Congo (16,0%), que não diferiram significativamente entre si (p > 0,05), e os menores com Giemsa (5,0%) e Rosa Bengala (8,5%) apresentaram os menores valores, também sem diferença significativa entre si (p > 0,05), enquanto Panótico Rápido (10,0%) não diferiu significativamente dos grupos identificados pelas letras a e b. Para o total de defeitos, Vermelho Congo apresentou o maior percentual (54,0%), diferindo significativamente dos demais métodos (p < 0,05), enquanto Panótico Rápido (39,5%), Giemsa (36,0%), Azul de Metileno (43,5%) e Rosa Bengala (40,0%) não diferiram significativamente entre si (p > 0,05). Esses resultados estão de acordo com o estudo de Czubaszek *et al.* (2019), que demonstrou que diferentes técnicas de coloração podem influenciar os parâmetros morfométricos dos espermatozoides. Os autores ressaltam a importância de considerar os reagentes utilizados e os procedimentos de fixação e coloração, uma vez que podem interferir nas dimensões e na visualização das estruturas espermáticas, influenciando a interpretação dos resultados morfológicos.

Tabela 3 – Percentual de espermatozoides normais e com defeitos morfológicos no cão 3, de acordo com o método de coloração

Cão 3	Normais	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Total de defeitos
Panótico Rápido	60,5%	29,5%	10,0%	39,5%
Giemsa	64,0%	31,0%	5,0%	36,0%
Azul de Metileno	56,5%	26,5%	17,0%	43,5%
Rosa Bengala	60,0%	31,5%	8,5%	40,0%
Vermelho Congo	46,0%	38,0%	16,0%	54,0%
CV %	9,14	7,10	6,24	4,34

Nota. CV - coeficiente de variação. Dados seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Os resultados referentes ao cão 4 (Tabela 4), foram observadas diferenças significativas entre os métodos de coloração para as características avaliadas. Para espermatozoides normais, o maior percentual foi observado com Azul de Metileno (71,0%), diferindo significativamente dos demais métodos ($p < 0,05$). Vermelho Congo apresentou o menor percentual (51,0%), ambos diferindo dos demais métodos ($p < 0,05$). Em relação aos defeitos menores, Vermelho Congo (37,5%) e Panótico Rápido (32,0%) apresentaram os maiores percentuais, sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$), mas diferindo dos demais métodos ($p < 0,05$). Giemsa (22,5%) e Rosa Bengala (23,5%) também não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), enquanto Azul de Metileno apresentou o menor percentual (12,0%), diferindo significativamente dos demais métodos ($p < 0,05$). Para defeitos maiores, Azul de Metileno apresentou o maior percentual (17,0%), diferindo significativamente dos demais métodos ($p < 0,05$), enquanto Panótico Rápido (8,0%), Giemsa (11,0%), Rosa Bengala (11,5%) e Vermelho Congo (11,5%) não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Quanto ao total de defeitos, Vermelho Congo apresentou o maior percentual (49,0%), diferindo significativamente dos demais métodos ($p < 0,05$). Giemsa (33,5%) e Azul de Metileno (29,0%) apresentaram os menores percentuais, sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$), enquanto Rosa Bengala (35,0%) e Panótico Rápido (40,0%) apresentaram valores intermediários, diferindo dos demais métodos ($p < 0,05$). Esses achados estão compatíveis com Klumb, Wehrend e Farshad (2026), no qual verificaram diferenças entre técnicas de coloração na prevalência de anormalidades morfológicas em sêmen canino e atribuíram tais variações não apenas a fatores biológicos, mas também às propriedades específicas de visualização e à susceptibilidade de cada método à formação de artefatos.

Tabela 4 – Percentual de espermatozoides normais e com defeitos morfológicos no cão 4, de acordo com o método de coloração

Cão 4	Normais	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Total de defeitos
Panótico Rápido	60,0%	32,0%	8,0%	40,0%
Giemsa	66,5%	22,5%	11,0%	33,5%
Azul de Metileno	71,0%	12,0%	17,0%	29,0%
Rosa Bengala	65,0%	23,5%	11,5%	35,0%
Vermelho Congo	51,0%	37,5%	11,5%	49,0%
CV %	6,02	6,35	7,65	8,66

Nota. CV - coeficiente de variação. Dados seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Os resultados obtidos para o cão 5 (Tabela 5) foram, Giemsa (68,0%) e Rosa Bengala (70,0%) apresentaram os maiores percentuais de espermatozoides normais, sem diferença entre si (p > 0,05), mas diferindo do Panótico Rápido (60,0%), do Azul de Metileno (62,5%) e do vermelho Congo (60,5%), que também não diferiram entre si (p > 0,05). Em relação aos defeitos menores, Panótico Rápido (27,0%) e vermelho Congo (28,0%) apresentaram os maiores percentuais, sem diferença entre si (p > 0,05), mas diferindo de Giemsa (24,0%), Azul de Metileno (24,0%) e Rosa Bengala (24,5%), que também não diferiram entre si (p > 0,05). Quanto aos defeitos maiores, Panótico Rápido (13,0%), Azul de Metileno (13,5%) e Vermelho Congo (11,5%) apresentaram os maiores percentuais, sem diferença entre si (p > 0,05), diferindo de Giemsa (8,0%) e Rosa Bengala (5,5%), que também não diferiram entre si (p > 0,05). Em relação ao total de defeitos, Panótico Rápido (40,0%), Azul de Metileno (37,5%) e Vermelho Congo (39,5%) apresentaram os maiores percentuais, sem diferença entre si (p > 0,05), enquanto Giemsa (32,0%) e Rosa Bengala (30,0%) apresentaram os menores, também sem diferença entre si (p > 0,05), diferindo dos demais métodos (p < 0,05). Os resultados obtidos estão de acordo com Çebi Şen *et al.* (2016), ao compararem diferentes métodos de avaliação da morfologia de espermatozoides epididimários de cães, observaram diferenças nos percentuais de alterações morfológicas identificadas entre as técnicas utilizadas, evidenciando que o método empregado pode influenciar os resultados da análise.

Tabela 5 – Percentual de espermatozoides normais e com defeitos morfológicos no cão 5, de acordo com o método de coloração

Cão 5	Normais	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Total de defeitos
Panótico Rápido	60,0%	27,0%	13,0%	40,0%
Giemsa	68,0%	24,0%	8,0%	32,0%
Azul de Metileno	62,5%	24,0%	13,5%	37,5%

Cão 5	Normais	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Total de defeitos
Rosa Bengala	70,0%	24,5%	5,5%	30,0%
Vermelho Congo	60,5%	28,0%	11,5%	39,5%
CV %	4,58	6,25	4,92	7,62

Nota. CV - coeficiente de variação. Dados seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferiram significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Os resultados demostram que o método de coloração pode influenciar a classificação morfológica dos espermatozoides com diferenças significativas entre alguns métodos pelo teste de Tukey (p < 0,05), conforme descrito por Çebi Şen *et al.* (2016), Surmacz *et al.* (2022), Andrade (2023), Jasmim *et al.* (2024), Mazzuchini, Novello e Segabinazzi (2024) e Costa *et al.* (2025), no qual verificaram que essa influência está relacionada às características de cada corante e à forma como as estruturas espermáticas são evidenciadas durante a análise microscópica, podendo resultar em diferenças na classificação dos defeitos. O Azul de Metileno apresentou maior percentual de espermatozoides normais e menor percentual de defeitos totais nos cães 1 e 4, enquanto o Vermelho Congo apresentou os maiores percentuais de defeitos totais nos cães 3 e 4. No entanto, os resultados variaram entre os animais, indicando que o comportamento dos métodos de coloração não foi o mesmo para todos os cães avaliados.

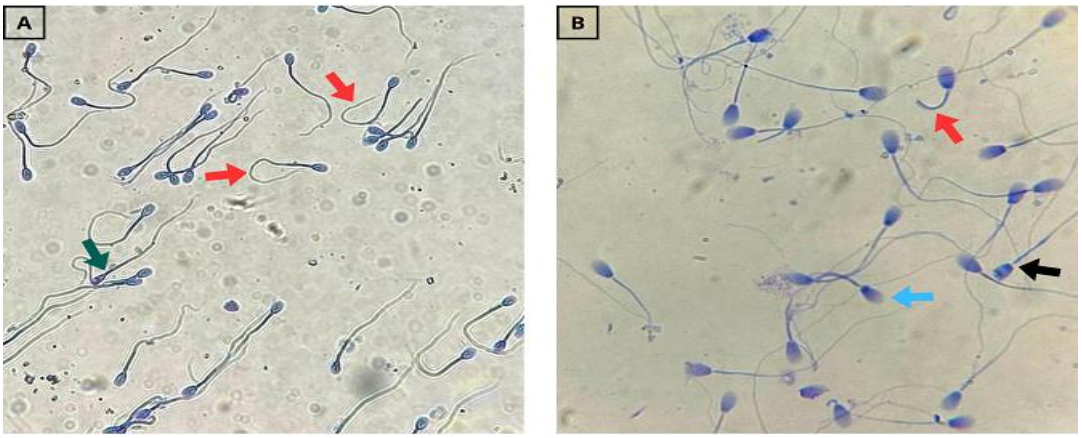
As diferenças observadas entre os cães podem estar relacionadas não somente ao método de coloração, mas também às características individuais dos animais. No presente estudo, os cães apresentavam idades entre 1 e 7 anos, faixa etária que deve ser considerada na interpretação dos resultados, uma vez que fatores individuais contribuem para a variabilidade da qualidade seminal. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos descritos por Bhanmeechao *et al.* (2018) e Tesi *et al.* (2018), que observaram maior proporção de espermatozoides morfologicamente normais em cães jovens, enquanto animais mais velhos apresentaram maior ocorrência de determinados defeitos espermáticos. Além da idade, características como raça, porte e manejo reprodutivo também podem contribuir para as diferenças observadas entre os animais. Neste contexto, Soler *et al.* (2017) identificaram diferenças na morfometria espermática entre raças, ressaltando a importância de considerar as características individuais na avaliação seminal.

Quanto aos tipos de alterações morfológicas, entre os defeitos maiores foram identificadas alterações na cabeça, na peça intermediária e na cauda, com destaque para formas piriformes, contorno anormal, defeitos de peça intermediária e caudas fortemente enroladas. Quanto aos defeitos menores, foram observados a predominância de cauda dobrada ou enrolada

e alterações no formato e no tamanho da cabeça. Os dados observados nesta pesquisa foram descritos por Jasmim *et al.* (2024) que obteve alterações de defeitos maiores e menores semelhantes.

A coloração pelo método Panótico Rápido (Figura 1) proporcionou visualização satisfatória das estruturas dos espermatozoides caninos, permitindo a identificação da cabeça, da peça intermediária e da cauda, com destaque para a definição da região da cabeça e da cauda, estando de acordo com Root Kustritz *et al.* (1998) e Jasmim *et al.* (2024). Os autores descrevem a importância e qualidade do uso do Panótico Rápido na identificação de alterações morfológicas.

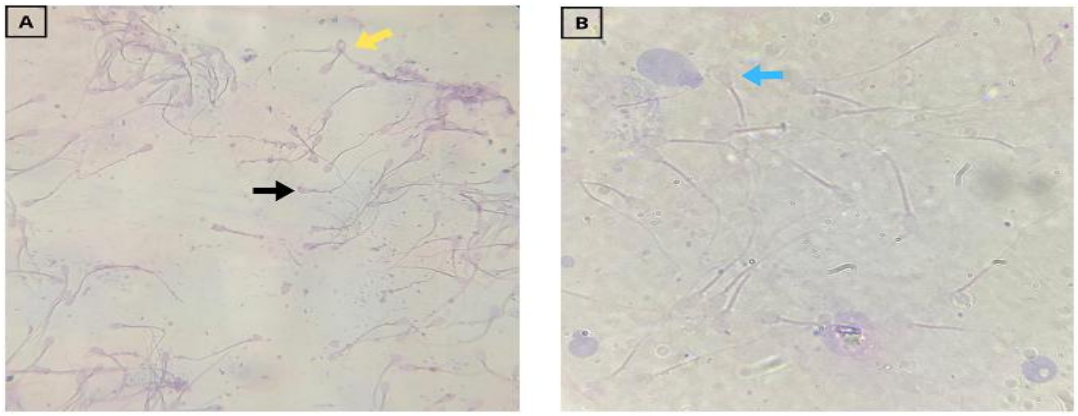
Figura 1 – Espermatozoides corados com Panótico Rápido. (A) seta vermelha: cauda dobrada; seta verde: subdesenvolvido. Microscopia óptica, aumento de 40x. (B) seta vermelha: cauda dobrada; seta preta: contorno anormal; seta azul: piriforme. Microscopia óptica, objetiva de imersão de 100x



Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

A coloração pelo método de Giemsa (Figura 2) permitiu uma visualização razoável das estruturas espermáticas, embora tenha apresentado limitações na delimitação dos contornos da cabeça. A peça intermediária apresentou coloração ligeiramente mais intensa, favorecendo sua identificação, concordando com Dahlbom *et al.* (1997), que ao avaliarem a morfometria da cabeça de espermatozoides caninos por meio de esfregaços corados com Giemsa e análise computadorizada de imagens, observaram variações nas dimensões e no formato das cabeças espermáticas, incluindo cabeças pequenas, estreitas, irregulares e gigantes. Dessa forma, as características de coloração observadas podem influenciar o contraste entre as diferentes estruturas e, consequentemente, a facilidade de identificação de determinadas alterações morfológicas.

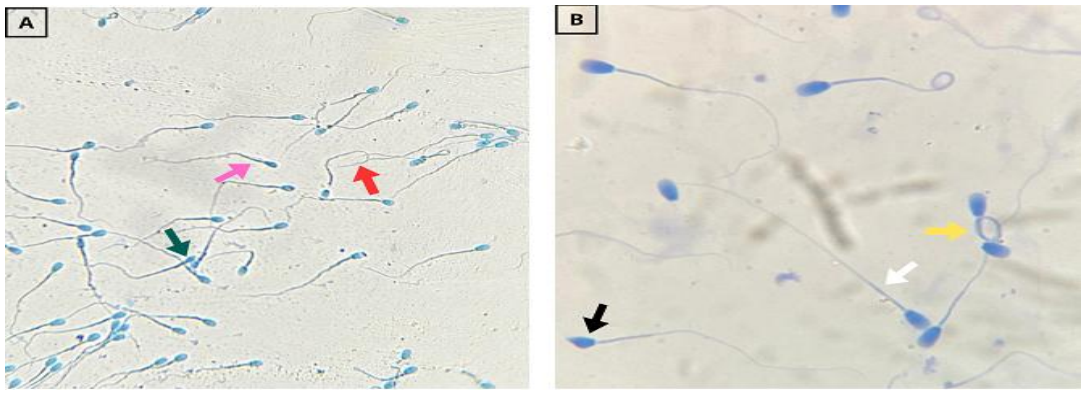
Figura 2 – Espermatozoides corados com Giemsa. (A) seta preta: contorno anormal; seta amarela: cauda fortemente enrolada. Microscopia óptica, aumento de 40x. (B) seta azul: piriforme. Microscopia óptica, objetiva de imersão de 100x



Fonte: Arquivo pessoal, 2026.

O Azul de Metileno (Figura 3) proporcionou menor contraste na região da cabeça espermática, dificultando a identificação de alterações morfológicas, especialmente as relacionadas ao acrossomo. De modo geral, observou-se uma coloração clara e relativamente uniforme dos espermatozoides, com maior evidência da peça intermediária, favorecendo sua identificação. Assim, embora tenha permitido avaliar o contorno geral dos espermatozoides, sua menor capacidade de evidenciar detalhes estruturais pode limitar a análise morfológica mais detalhada. Esses resultados estão de acordo com Surmacz *et al.* (2022), que destacam a influência da técnica de coloração na identificação e classificação dos defeitos morfológicos em espermatozoides caninos, reforçando que o contraste proporcionado pelo corante pode interferir na visualização de determinadas estruturas.

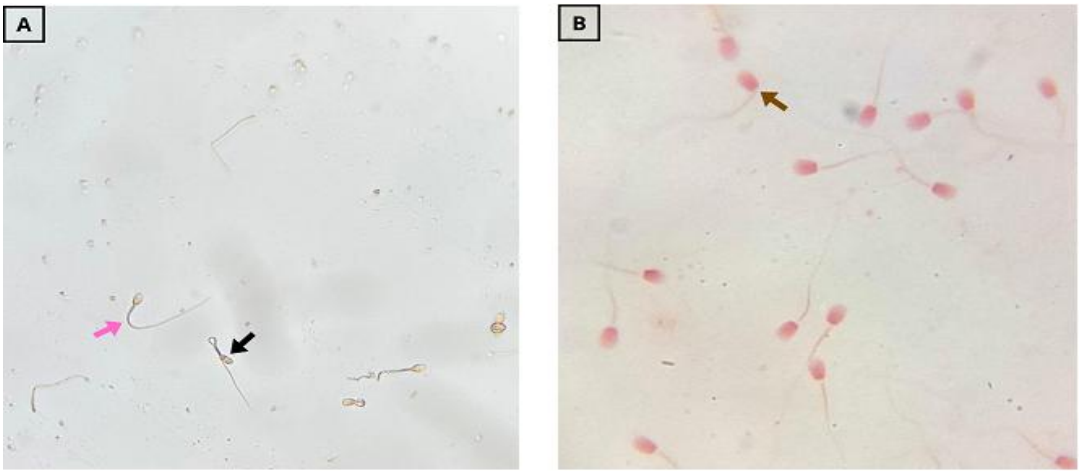
Figura 3 – Espermatozoides corados com Azul de Metileno. (A) seta verde: Subdesenvolvido; seta rosa: defeito de peça intermediária; seta vermelha: cauda dobrada. Microscopia óptica, aumento de 40x. (B) seta preta: contorno anormal; seta amarela: cauda fortemente enrolada; seta branca: Normal. Microscopia óptica, objetiva de imersão de 100x



Fonte: Arquivo pessoal, 2026.

O Vermelho Congo (Figura 4) apresentou boa afinidade pelas estruturas espermáticas, permitindo a visualização satisfatória da peça intermediária e da cauda. Entretanto, a coloração mais homogênea dificultou a identificação de alterações discretas na cabeça espermática. Esses resultados estão de acordo com Root Kustritz *et al.* (1998), que destacam a influência das técnicas de coloração na avaliação da morfologia dos espermatozoides caninos. Dessa forma, as diferenças de contraste entre as estruturas podem interferir na identificação de determinados defeitos morfológicos. Entretanto, a escassez de estudos que avaliem especificamente o uso do Vermelho Congo na análise da morfologia espermática canina limita a comparação direta dos resultados, reforçando a necessidade de novas pesquisas que investiguem sua capacidade de evidenciar as diferentes estruturas espermáticas e identificar alterações morfológicas, comparando seu desempenho com o de outros métodos de coloração.

Figura 4 – Espermatozoides corados com Vermelho Congo. (A) seta preta: contorno anormal; seta rosa: de peça intermediária. Microscopia óptica, aumento de 40x. (B) seta marrom: Inserção abaxial. Microscopia óptica, objetiva de imersão de 100x

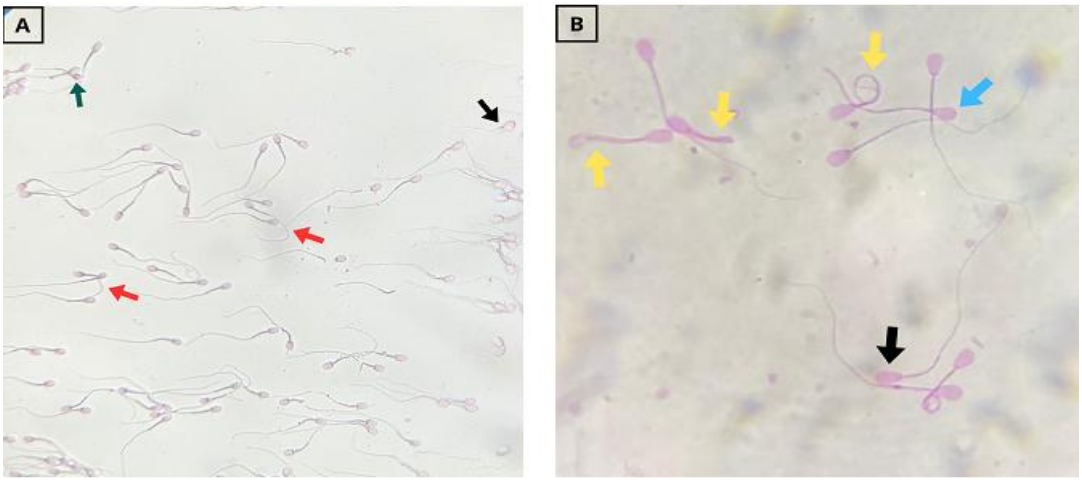


Fonte: Arquivo pessoal, 2026.

A coloração com Rosa Bengala (Figura 5) mostrou-se eficaz na avaliação geral da morfologia dos espermatozoides, proporcionando coloração intensa do núcleo e facilitando a visualização de seu contorno. A peça intermediária apresentou bom contraste, enquanto a cauda mostrou coloração mais intensa, favorecendo a observação de sua extensão. Entretanto, a intensidade da coloração pode dificultar a identificação de alterações mais discretas na cabeça e no acrossomo. Esses resultados estão de acordo com Klumb, Wehrend e Farshad (2026), que, ao compararem diferentes técnicas de coloração em sêmen canino descongelado, também observaram que o Rosa Bengala proporcionou bom contraste e visualização das estruturas espermáticas. Dessa forma, esse corante demonstra potencial para a avaliação morfológica,

embora a intensidade da coloração deva ser considerada na identificação de alterações mais sutis.

Figura 5 – Espermatozoides corados com Rosa Bengala. (A) seta verde: subdesenvolvido; seta vermelha: cauda dobrada; seta preta: contorno anormal. Microscopia óptica, aumento de 40x. (B) seta Amarela: cauda fortemente enrolada; Seta azul: Piriforme; Seta preta: contorno anormal. Microscopia óptica, objetiva de imersão de 100x



Fonte: Arquivo pessoal, 2026.

Os resultados deste estudo demonstraram que os métodos de coloração influenciam a avaliação da morfologia espermática canina, uma vez que apresentam diferenças na evidenciação das estruturas celulares e na identificação de alterações morfológicas. As diferenças observadas entre os corantes (Figura 6) reforçam a importância da escolha da técnica utilizada na análise do sêmen, estando de acordo com autores Surmacz *et al.* (2022) e Mazzuchini, Novello e Segabinazzi (2024), que demonstraram que a técnica de coloração utilizada pode interferir na visualização e na identificação dos defeitos espermáticos.

Tabela 6 – Principais estruturas espermáticas avaliadas e características observadas em cada método de coloração

Corante	Estrutura/avaliação mais favorecida	Características observadas
Panótico Rápido	Cabeça, peça intermediária e cauda	Melhor visualização da forma e do tamanho da cabeça, facilitando a identificação de alterações de contorno.
Giemsa	Peça intermediária e cauda	Apresentou melhor visualização dessas regiões, contribuindo para a identificação de alterações na peça intermediária e na cauda.
Azul de Metileno	Morfologia geral	Permitiu uma avaliação mais geral do espermatozoide e de seu contorno, porém apresentou menor detalhamento das estruturas internas.
Vermelho Congo	Peça intermediária e cauda	Permitiu boa visualização das alterações relacionadas à peça intermediária e cauda.
Rosa Bengala	Núcleo, peça intermediária e cauda	Apresentou coloração mais intensa nessas estruturas, facilitando sua visualização. A intensidade da coloração pode dificultar a percepção de alterações internas mais sutis.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os métodos de coloração avaliados permitiram a visualização das estruturas espermáticas caninas, embora tenham apresentado diferenças quanto à qualidade da visualização e à praticidade. Entre eles, o Giemsa destacou-se como a opção mais favorável para a avaliação morfológica geral, apresentando resultados positivos quanto à proporção de espermatozoides normais e aos defeitos totais, apesar de apresentar limitações na visualização dos contornos da cabeça espermática. O Panótico, por sua vez, destacou-se pela praticidade e rapidez do procedimento, características vantajosas para a rotina laboratorial. Entretanto, são necessários mais estudos para estabelecer o método de coloração mais adequado à avaliação da morfologia espermática em cães.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, H. S. **Influência de diferentes métodos de coloração sobre a morfologia espermática de caprinos.** 2023. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2023.

APPARÍCIO, M.; VICENTE, W.R.R. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1.ed. São Paulo: MedVet, 2015. p.159-162.

ARLT, S. P.; REICHLER, I. M.; HERBEL, J.; SCHÄFER-SOMI, S.; RIEGE, L.; LEBER, J.; FREHNER, B. Diagnostic tests in canine andrology – What do they really tell us about fertility? **Theriogenology**, v. 196, p. 150–156, 2023.

BHANMEECHAO, C.; SRISUWATANASAGUL, S.; PRAPAIWAN, N.; PONGLOWHAPAN, S. Reproductive aging in male dogs: The epididymal sperm defects and expression of androgen receptor in reproductive tissues. **Theriogenology,** v. 108, p. 74–80, 2018.

BRITO, L. F. C.; SILVA, M. C.; KOLSTER, K. A. Standardisation of dog sperm morphology classification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 60, n. 2, e70024, 2025.

CAVALCANTI, T. P.; PEREIRA, A. G.; BEZERRA, L. G. P.; MOREIRA, S. S. J.; SILVA, A. M.; SILVA, A. R. Conservação da capacidade ligante de espermatozoides caninos refrigerados em diluente tris-gema. **Ciência Animal,** v. 30, n. 4, p. 252–256, 2020.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

ÇEBI ŞEN, Ç.; FAUNDEZ, R.; JURKA, P.; AKÇAY, E.; PETRAJTIS-GOLOBOW, M.; AMBARCIOĞLU, P. Evaluation of the canine epididymal sperm morphology with two different staining methods, one fixative solution and Motile Sperm Organelle Morphology Examination (MSOME). **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 22, n. 1, p. 57–62, 2016.

CHRISTENSEN, B. W.; MEYERS, S. Canine semen evaluation and processing. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 53, n. 5, p. 921–930, 2023.

COSTA, L. R.; ESTEVAM, J. N.; BASTOS, M. E. N.; ARAÚJO, L. B.; AQUINO, J. V. M.; SANTOS, A. V. P.; LEITE, D. K. V. H. Comparison of staining techniques for sperm morphological evaluation in canine semen. **Studies and Sciences in Agriculture**, v.1, p. 47–55, 2025.

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.

DAHLBOM, M.; ANDERSSON, M.; VIERULA, M.; ALANKO, M. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. **Theriogenology**, v. 48, n. 4, p. 687–698, 1997.

DOMRAZEK, K.; KONIECZNY, P.; MAJKA, M.; CZOPOWICZ, M.; JURKA, P. The impact of microorganisms on canine semen quality. **Animals**, v. 14, n. 9, art. 1267, 2024.

DONATO, A. C. D.; LUZ, M. R.; CRUSCO, S. E. Mercado internacional para a andrologia brasileira em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 50, n. 1, p. 138–141, 2026.

JASMIM, J. S.; COSTA, C. R.; OLIVEIRA, I. M.; MEDEIROS, L. J. S.; ALMEIDA, L. E. F.; PINA, E. P. S.; SANTOS, A. V. P.; LEITE, D. K. V. H. Importância da avaliação da morfologia espermática na inseminação artificial (IA) na espécie canina. **Revista FT**, v. 29, n. 141, p. 31–32, dez. 2024.

KLUMB, I. S.; WEHREND, A.; FARSHAD, A. Comparative evaluation of staining techniques in thawed cryopreserved dog semen. **Veterinary Sciences**, v. 13, n. 7, art. 627, 2026.

KOLSTER, K. A. Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,** v. 48, n. 4, p. 533–545, 2018.

MAZZUCHINI, M.; NOVELLO, G.; SEGABINAZZI, L. Modified diff-quick staining for canine sperm morphology. **Clinical Theriogenology**, v. 16, art. 10243, 2024.

MONTEIRO, K. S.; BERGMANN, L. J.; FERREIRA, B. C.; LIRA, G. M.; MARQUES, T. F. R.; FONSECA, T. C.; BERALDO, E.; MURGAS, L. D. S. Inseminação artificial e acompanhamento da gestação em uma cadela da raça Bull Terrier com histórico de agressividade: relato de caso. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, n.1, p. 1–5, 2020.

MOTHÉ, G. B.; DA SILVA, J. V. N.; BATISTA, J. C.; DA CUNHA, M. G. L.; DO NASCIMENTO, J. C.; BASTOS, G. G.; MOREIRA, L. L. A.; PEREIRA, R. R.; LINHARES, R. G.; MENDES JUNIOR, A. F. Desenvolvimento anatômico dos testículos de cães e as implicações clínicas do criptorquidismo. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 6, e2513646024, 2024.

ROOT KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N.; JOHNSTON, S. D.; ROOT, T. K. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 4, p. 348–352, 1998.

SILVA, B. P.; FERNANDES, C. B.; CARVALHO, G. G. M.; PINA, E. P. S.; SOARES, P. F. C.; CHAGAS, W. N.; LEITE, D. K. V. H. Exame andrológico e ultrassonográfico em um touro da raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*) – relato de caso. **Revista Delos**, v. 18, n. 63, p. 1–24, 2025.

SILVA, L. M.; SILVA, C. M. G.; CAVALCANTE, T. V.; FERREIRA, J. L.; SOUZA, J. A. T. de. Utilização do corante Rosa Bengala no método de preparação úmida para avaliação morfológica de sêmen ovino. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 174–180, 2008.

SOLER, C.; ALAMBIAGA, A.; MARTÍ, M. A.; GARCÍA-MOLINA, A.; VALVERDE, A.; CONTELL, J.; CAMPOS, M. Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. **Asian Journal of Andrology**, v. 19, n. 2, p. 149–153, 2017.

SOUZA, A. P. C.; SANTOS, N. R. A.; ALMEIDA, L. E. F.; SANTOS, A. V. P.; LEITE, D. K. V. H. Inseminação artificial com sêmen a fresco em uma cadela da raça Pastor de Shetland: relato de caso. **Revista FT**, v. 27, n. 122, p.1-12, 2023.

SURMACZ, P.; NIWINSKA, A.; KAUTZ, E.; GIZINSKI, S.; FAUNDEZ, R. Comparison of two staining techniques on the manual and automated canine sperm morphology analysis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 6, p. 678–684, 2022.

TESI, M.; SABATINI, C.; VANNOZZI, I.; DI PETTA, G.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: a retrospective study. **Theriogenology**, v. 118, p. 34–39, 2018.

TRENTI, D.; CARLOTTI, D. N.; PIN, D.; BENSIGNOR, E.; TOULZA, O. Suspected contact scrotal dermatitis in the dog: a retrospective study of 13 cases (1987 to 2003). **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 295–300, 2011.

URLI, S.; CORTE PAUSE, F.; DREOSSI, T.; CROCIATI, M.; STRADAIOLI, G. Evaluation of an artificial intelligence system for bull sperm morphology evaluation. **Theriogenology**, v. 245, art. 117504, 2025.

WYSOKIŃSKA, A. Animal reproduction: semen quality assessment. **Animals**, v. 12, n. 21, art. 2905, 2022.