

Peculiaridades e desafios nas análises espermáticas de abelhas, aves e mamíferos selvagens

Peculiarities and challenges in sperm analysis of wild bees, birds and mammals

Luana Grasielle Pereira Bezerra, Lilian Leal Dantas, Pedro Augusto Pinheiro Brito, Gabriel Santos Costa Bezerra, Alexandre Rodrigues Silva*

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal - LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil

Resumo

A biodiversidade mundial tem enfrentado sérios riscos, que tem ocasionado a perda constante de espécies diversas de insetos, aves e mamíferos, dentre outros. Nesse contexto, estudos com ênfase na caracterização do espermatozoide são importantes, pois auxiliam na compreensão da fisiologia reprodutiva bem como na determinação da qualidade do sêmen para seu posterior uso em biotécnicas reprodutivas. Um dos principais desafios ao se trabalhar com essas espécies, no entanto, é que os principais métodos de coleta e avaliações seminais foram desenvolvidos visando atender animais domésticos. Dessa forma, análises específicas em animais selvagens têm mostrado que cada espécie apresenta características próprias que exigem ajustes metodológicos. A escolha do corante para avaliação morfológica, por exemplo, varia de acordo com a capacidade de contraste e definição das estruturas espermáticas — o rosa bengala tem se mostrado eficiente em várias espécies. A motilidade espermática também se apresenta de forma distinta entre os animais, sendo influenciada por fatores como aglutinação celular ou viscosidade do plasma seminal. Testes de funcionalidade de membrana com soluções hipoosmóticas revelam diferentes respostas, sendo necessário ajustar a concentração da solução conforme a espécie. Essa revisão teve o objetivo de explorar os desafios e avanços recentes nas técnicas de avaliação das características do sêmen de abelhas, aves e mamíferos selvagens.

Palavras-chave: zangões, pássaros, vida selvagem, espermograma, reprodução assistida

Abstract

Global biodiversity has faced serious risks, which have led to the constant loss of several species of insects, birds and mammals, among others. In this context, studies that emphasize the detailed characterization of sperm, addressing aspects such as morphology, motility, structural integrity and functionality of the plasma membrane are important, as they help in the understanding of reproductive physiology as well as in determining the quality of semen for its subsequent use in reproductive biotechnologies. One of the main challenges when working with these species, however, is that the main methods of semen collection and evaluation were developed with the aim of serving domestic animals. Thus, specific analyses in wild animals have shown that each species has its own characteristics that require methodological adjustments. The choice of dye for morphological evaluation, for example, varies according to the capacity for contrast and definition of sperm structures — rose bengal has proven efficient in several species. Sperm motility also presents itself differently among animals, being influenced by factors such as cell agglutination or seminal plasma viscosity. Membrane functionality tests with hypoosmotic solutions reveal different responses, and it is necessary to adjust the concentration of the solution according to the species analyzed. This review aimed to explore the challenges and recent advances in techniques for evaluating the characteristics of semen from bees, birds and wild mammals.

Keywords: drones, birds, wildlife, spermogram, assisted reproduction

Introdução

A extinção de espécies faz parte do processo natural de evolução e é irreversível, porém, atualmente, está ocorrendo em uma taxa muito maior do que a especiação por causa de atividades humanas, como destruição de habitat e caça excessiva (Comizzoli et al, 2000). Nesse contexto, a conservação de espécies é fundamental, pois a extinção de uma única espécie pode afetar o equilíbrio de ecossistemas

inteiros (Comizzoli et al., 2009).

As biotecnologias reprodutivas são ferramentas que contribuem para salvar e manter espécies ameaçadas (Comizzoli et al., 2015). Alguns sucessos com o uso da inseminação artificial em programas de conservação já foram relatados, o rinoceronte branco do Sul (*Ceratotherium simum simum*) é um exemplo (Hermes et al., 2009). É válido ressaltar que neste caso, o filhote foi obtido apenas na segunda inseminação com uma amostra de sêmen criopreservado de melhor qualidade do que a primeira (Hermes et al., 2009). Desse modo, a qualidade do sêmen seja a fresco ou criopreservado é imprescindível para o sucesso da inseminação artificial. Sendo assim, fica clara a importância de se determinar a qualidade do sêmen por meio das avaliações seminais nos programas de reprodução assistida (Tanga et al., 2021).

A avaliação do sêmen mede vários parâmetros de qualidade dos espermatozoides como indicadores de fertilidade (Tanga et al., 2021). No entanto, a avaliação do sêmen tem limitações, principalmente, em espécies selvagens pois não há uma padronização das técnicas. Esta revisão explora os desafios e avanços recentes na avaliação das características de qualidade do sêmen de abelhas, aves e mamíferos selvagens.

As Abelhas

As abelhas desempenham um papel essencial na polinização, além de serem responsáveis pela produção de mel e outros produtos apícolas. Mundialmente, são conhecidas mais de 20.000 espécies descritas, que se diferenciam tanto morfológicamente quanto fisiologicamente (Ascher e Pickering, 2014).

Apesar da grande diversidade de espécies, a Fundação Heinrich Böll, entre 2022 e 2023, estimou que, no Brasil, mais de 300 milhões de abelhas morreram devido à intoxicação por agrotóxicos (Stiftung, 2024). Assim, compreender as diferentes características espermáticas dos zangões é fundamental para futuros estudos sobre as espécies, bem como para a conservação da biodiversidade.

Cópula e coleta do sêmen

As abelhas rainhas são altamente poliândricas e, em seu habitat natural, copulam com um grande número de zangões. Em média, as rainhas virgens acasalam com 30 a 44 zangões ao longo de até seis dias consecutivos (Abrol, 2023).

Na inseminação instrumental, o primeiro passo é a coleta de sêmen do zangão, realizada por meio da técnica de eversão do endofalo. Essa etapa exige treinamento e o uso de equipamentos especializados para coletar o sêmen (Cobey et al., 2013). O estímulo para a eversão é realizado manualmente, aplicando-se uma suave pressão no abdômen do zangão, expondo parcialmente o endofalo, seguido, naturalmente, de sua eversão total. Dessa forma, o sêmen se localiza na ponta do endofalo, ao lado de um muco branco. Cada zangão produz aproximadamente 1 µL de sêmen, uma quantidade considerada pequena em comparação com outros animais (Mendes, 2008). Para a realização da inseminação instrumental em uma rainha, são necessárias coletas de vários zangões, totalizando entre 8 a 12 µL de sêmen (Cobey et al., 2013).

Morfologia espermática

Os espermatozoides dos zangões *Apis* são células longas (Tab. 1) e filamentosas, com extremidades afiladas (Fig. 1 A). Apresentam dois derivados de mitocôndrias, axonema e dois corpos triangulares adicionais (Gulov e Bragina, 2022). Os espermatozoides do grupo *Meliponini*, conhecidas como abelhas sem ferrão, também se apresentam longos e delgados (Tab. 1). Na região da cabeça, observa-se um acrossomo e um núcleo, enquanto na região da cauda possuem um axonema, composto por um adjunto centriolar, um par de derivados mitocondriais e um par de corpos acessórios (Zama et al., 2004). Ademais, fatores como a espécie, idade, estação do ano, genética, temperatura, nutrição e variações sazonais, como as estações de seca e de chuva podem influenciar nas características espermáticas (Moraes et al., 2022).

Motilidade espermática

Diferentemente de outras espécies, os zangões apresentam um padrão de movimento espermático predominantemente circular, com formato helicoidal (Murray et al., 2022). Devido às características morfológicas dos espermatozoides de zangão, que possuem cabeça fina e estreita, suas análises não conseguem ser realizadas no equipamento de Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA). Esse método avalia a motilidade, a morfologia, os parâmetros cinéticos e outras características dos

espermatozoides com base em suas propriedades morfológicas, por meio das coordenadas X e Y precisas do espermatozoide, utilizando sua cabeça como ponto de referência (Lu et al., 2014). No entanto, como as cabeças dos espermatozoides dos zangões são indistinguíveis de suas caudas, essa análise torna-se inviável. Dessa forma, a avaliação da motilidade dos espermatozoides pelo sistema CASA não pode ser realizada apenas com a microscopia de contraste de fase, a menos que seja combinada com microscopia fluorescente (Murray et al., 2022). Com isso, foi desenvolvido o sistema CASABee, um software de código aberto projetado especificamente para a análise automática da motilidade e concentração de espermatozoides em zangões.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ EP) da morfometria dos espermatozoides de abelhas, aves e mamíferos silvestres.

Espécie	Cabeça		Comprimento Peça intermediária (μ m)	Comprimento Cauda (μ m)	Comprimento Total (μ m)	Referência
	Comprimento (μ m)	Largura (μ m)				
Zangão (<i>Apis</i>)	9,00-10,00	4,00-5,00	-	253,47 $\pm$ 1,20	-	Peng et al., 1993, Morais et al., 2022
Zangão (<i>Meliponini</i>)	-	-	-	-	80,00 a 300,00	Zama et al., 2004
Ema (<i>Rhea americana</i>)	7,54 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,00	2,12 $\pm$ 0,04	31,00 $\pm$ 0,09	40,8 $\pm$ 0,11	Bezerra et al., 2023a
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	6,34 $\pm$ 0,02	4,20 $\pm$ 0,02	13,29 $\pm$ 0,03	32,25 $\pm$ 0,07	50,7 $\pm$ 0,12	Sousa et al., 2013a
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>)	4,89 $\pm$ 0,10	3,27 $\pm$ 0,01	5,52 $\pm$ 0,02	31,19 $\pm$ 0,07	41,6 $\pm$ 0,07	Dantas et al., 2022a
Preá (<i>Galea spixii</i>)	4,61 $\pm$ 0,10	3,04 $\pm$ 0,00	5,13 $\pm$ 0,00	44,26 $\pm$ 0,10	48,9 $\pm$ 0,10	Silva et al., 2017
Tatu de seis bandas (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	10,90 $\pm$ 3,20	13,00 $\pm$ 3,80	-	64,70 $\pm$ 1,10	77,6 $\pm$ 1,20	Sousa et al., 2013b
Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	4,90 $\pm$ 0,02	3,60 $\pm$ 0,03	9,70 $\pm$ 0,30	54,50 $\pm$ 4,40	59,5 $\pm$ 0,10	Silva et al., 2019
Gato-do-mato- pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	2,51 $\pm$ 0,01	1,46 $\pm$ 0,01	4,39 $\pm$ 0,01	22,60 $\pm$ 0,10	29,5 $\pm$ 0,10	Matos, 2023

No estudo de Divasón et al. (2023), o software foi utilizado para comparar a análise manual e a análise realizada pelo CASABee em relação aos valores de motilidade e concentração espermática. Os resultados obtidos foram, respectivamente, uma motilidade de 68,74 $\pm$ 24,56 % na análise manual e de 68,82 $\pm$ 24,81 % no CASABee. Já os valores de concentração espermática foram de 5,35 $\pm$ 2,85 $\times 10^6$ espermatozoides/mL na análise manual e de 4,85 $\pm$ 2,57 $\times 10^6$ espermatozoides/mL no CASABee. Esses resultados demonstram a eficiência do software, que permite realizar a análise de forma rápida e precisa, reduzindo o tempo necessário para cerca de 10 a 20 segundos.

Integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de zangões pode ser avaliada utilizando sondas fluorescentes (Morais et al., 2022), como o Hoechst 33342 e o iodeto de propídio (IP). No estudo de Nur et al. (2012), a viabilidade dos espermatozoides de zangão foi avaliada por meio das sondas fluorescentes, o SYBR-14 que marca os espermatozoides vivos e com membranas intactas e o IP que marca células mortas e com membranas danificadas. Além disso, foram realizados testes para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides de zangão, comparando água destilada (0 mOsm/L) e diferentes soluções hiposmóticas (50, 100 e 150 mOsm/L) (Nur et al., 2012). Os resultados indicaram que, no teste de inchaço hiposmótico, a água destilada (mOsm/L), foi a mais eficaz,

permitindo uma melhor identificação dos espermatozoides funcionais com base no grau de enrolamento da cauda.

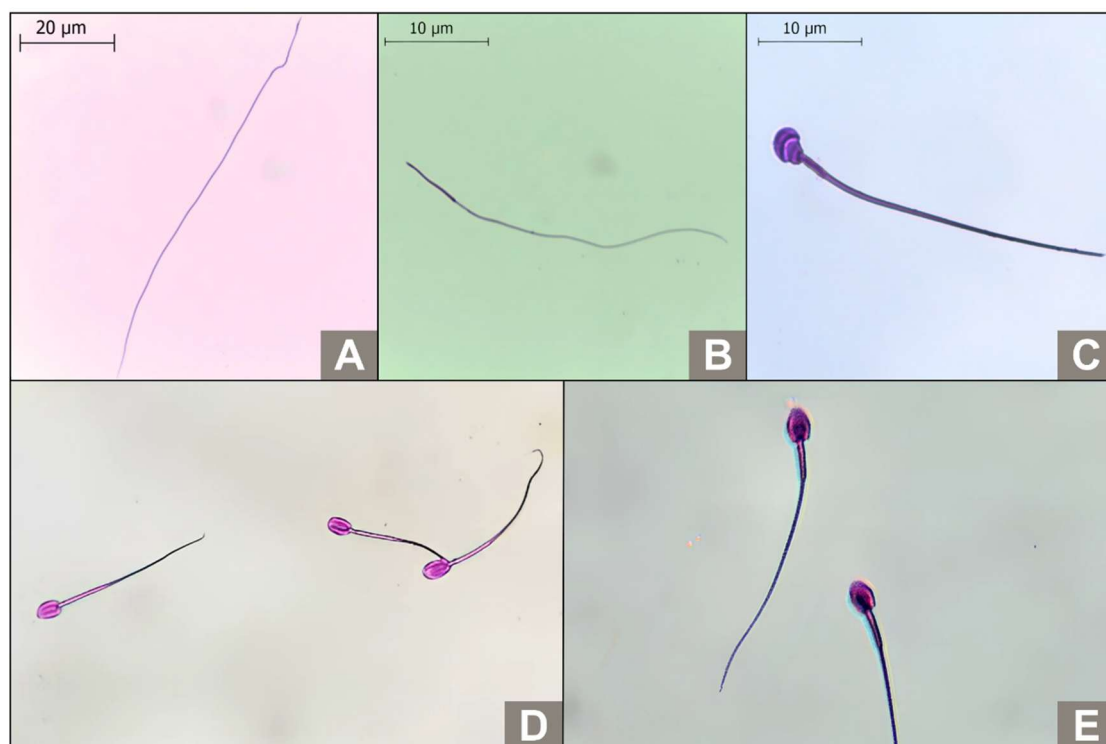


Figura 1. Variação morfológica dos espermatozoides de diferentes espécies corados com Rosa Bengala. (A) Zangão Europeu Italiano (*Apis mellifera ligustica*); (B) Ema (*Rhea americana*); (C) Preá (*Galea spixii*); (D) Cateto (*Pecari tajacu*); (E) Cutia (*Dasyprocta leporina*).

Atividade e potencial mitocondrial

Em zangões *Apis mellifera*, há poucos estudos que analisam a atividade mitocondrial, embora alguns artigos tenham utilizado a sonda fluorescente Rhodamina 123 (Alcay et al., 2022). Esta sonda fluorescente é específica para a marcação de mitocôndrias em células vivas (Garner et al., 1997). Entretanto, a ligação dessa sonda às mitocôndrias é difícil de ser calculada, devido à heterogeneidade dessas organelas nas células, como, a variação no número de mitocôndrias maduras e imaturas (Angrimani et al., 2015).

Outra forma de marcar a peça intermediária, é por meio do iodeto de 5,5', 6,6' tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), um tipo especial de carbocianina capaz de identificar a diferença de potencial mitocondrial (Angrimani et al., 2015). Em seu estudo, Kaya e Uysal (2023) utilizaram essa sonda para detectar o potencial de membrana mitocondrial em zangões, observando que os espermatozoides com alto potencial de membrana eram marcados em laranja, enquanto aqueles com baixo potencial eram marcados em verde. Além disso, a utilização do JC-1 pode ser associada a outras sondas fluorescentes, como o Hoechst 33342 e o IP, permitindo a avaliação conjunta da integridade das membranas plasmáticas e do potencial da membrana mitocondrial (Angrimani et al., 2015).

As aves

As aves desempenham um papel fundamental nos ecossistemas, contribuindo para o equilíbrio da natureza. Elas atuam como polinizadoras e como dispersoras de sementes, auxiliando na reprodução das plantas e participam de cadeias alimentares contribuindo para a manutenção (Mahendiran e Azeez, 2018). Embora sejam essenciais, mais de uma em cada oito aves estão em risco de extinção (Birdlife International, 2022).

Sabe-se que os seus espermatozoides possuem diferenças morfológicas e bioquímicas em relação aos de mamíferos, os quais foram a base para o desenvolvimento das avaliações espermáticas. Dessa forma,

compreender as peculiaridades nas avaliações espermáticas de aves pode contribuir para resultados mais fidedignos nas pesquisas.

Coleta de sêmen e de espermatozoides do ducto deferente

A coleta de sêmen em aves apresenta particularidades que são importantes destacar. Um exemplo é que devido à proximidade das regiões de coprodeu (recebe resíduos do sistema digestivo), urodeu (recebe resíduos do sistema urinário) e proctodeu (responsável pela cópula) na cloaca das aves há alta probabilidade de obtenção de sêmen contaminado com fezes, uratos e bactérias prejudiciais ao sêmen (Donoghue e Wishart, 2000). Outro fator limitante é que a grande maioria das espécies selvagens apresenta reprodução sazonal, restringindo a coleta em períodos restritos (Blanco et al., 2009).

Para a coleta de sêmen em aves domésticas e selvagens são relatadas três técnicas principais: massagem digital, coleta cooperativa e eletroestimulação (Pereira e Blank, 2017). A massagem digital foi desenvolvida em galos domésticos, atualmente é utilizada na reprodução de perus em escala comercial, mas também foi relatado em aves Gruiformes (Brown et al., 2018) e Psittaciformes (Stelzer et al., 2005). Nas aves maiores como avestruzes (*Struthio camelus*) (Al-Daraji e Al-Shemmary, 2015) e emas (*Rhea americana*) (Góes et al., 2010) a massagem é feita na papila do ducto seminífero no apêndice copulador semelhante ao pênis, sendo a eficiência de coleta nas emas de 66%.

Na coleta cooperativa as aves ejaculam voluntariamente em dispositivos (chapéus, manequins, poleiros, etc.) em resposta a estímulos comportamentais como vocalização (Blanco et al. 2009). É bastante utilizada em falconiformes (Cardoso et al., 2020).

Como muitas aves selvagens, como psitacídeos, são difíceis de manusear, a eletroestimulação tem se mostrado uma técnica útil, rápida e reduzir o estresse do manuseio. Frediani et al. (2019) realizaram coletas por eletroejaculação em aves de diferentes ordens (Piciformes, Strigiformes, Accipitriformes, Cathartiformes, Galiformes, Anseriformes e Psittaciformes) obtendo taxas de sucesso de coleta variáveis (0–50%) dependendo da espécie.

Além disso, é possível coletar espermatozoides do epidídimo e ducto deferente de aves valiosas que morreram repentinamente, usando a técnica de flutuação. Neste método, os ductos deferentes e epidídimos são fatiados em uma placa de Petri contendo diluente, os espermatozoides nadam para fora das estruturas e o diluente contendo os espermatozoides é então recuperado com o auxílio de pipeta (Bezerra et al., 2023ab). Esta metodologia foi recentemente mencionada em emas apresentando resultados satisfatórios para pesquisas de caracterização do espermatozoide da espécie (Bezerra et al., 2023a).

Morfologia espermática

De maneira geral a avaliação de espermatozoides em esfregaços corados é a mais utilizada, pois é rápida, de fácil visualização e de custo acessível. Um exemplo de corante que tem sido utilizado na avaliação morfológica de espermatozoides de aves é a eosina-nigrosina. Este corante já foi amplamente utilizado na avaliação morfológica de esperma fresco e criopreservado de grou (*Grus vipio* e *Grus americana*) (Brown et al. 2018). Esfregaços usando azul de anilina foram relatados na avaliação morfológica de espermatozoides de águia-real (*Aquila chrysaetus*) (Villaverde-Morcillo et al., 2015).

O rosa de bengala também é um corante utilizado em espermatozoides (Fig. 1 B), seu uso foi relatado para caracterização dos espermatozoides obtidos dos epidídimos e ductos deferentes de emas (Bezerra et al., 2023a). Assim, foi observado nos espermatozoides dos ductos deferentes uma média de $75,6 \pm 1,8\%$ de normalidade e os defeitos mais comuns foram macrocefalias ($9,5 \pm 9,0\%$) seguido de caudas dobradas ($8,3 \pm 1,3\%$). Além disso, foi descrita a morfometria (Tab. 1).

Motilidade e parâmetros cinéticos dos espermatozoides

Em aves, o uso dos sistemas de avaliações computadorizadas de sêmen (CASAs) para avaliar os parâmetros cinemáticos dos espermatozoides já foi relatado no sêmen fresco e criopreservado de espécies como a águia-real (*Aquila chrysaetus*) (Villaverde-Morcillo et al. 2015), avestruz (Smith et al. 2016), grou (Brown et al. 2018) e falcão peregrino (*Falco peregrinus*) (Cardoso et al. 2020).

Embora os sistemas CASAs sejam ferramentas formidáveis, ainda existem alguns desafios quanto ao seu uso em espécies selvagens. Para que o sistema possa avaliar os espermatozoides é necessário fornecer um *set up*, com informações prévias da célula espermática da espécie que será avaliada. Para animais domésticos esses *set ups* são bem estabelecidos podendo até vir configurados no próprio software, porém para espécies selvagens é necessário, primeiramente, estabelecer essas configurações. Recentemente nossa

equipe estabeleceu as características para a avaliação dos espermatozoides de emas (Bezerra et al., 2023). O set up das emas foi configurado a partir do set up dos emus (Sood et al., 2012), outra ave ratita o qual já se havia um relato.

Integridade estrutural e funcional da membrana plasmática

A avaliação da integridade estrutural da membrana pode ser realizada por meio de corantes vitais, esses corantes tornam a avaliação rápida, fácil e permitem o uso em campo. Recentemente, os corantes eosina-negrosina e o azul de bromofenol foram comparados para a avaliação da membrana dos espermatozoides de emas, sendo observados $64,6 \pm 5,2\%$ de espermatozoides com membrana intacta quando avaliados com o corante azul de bromofenol, $72,1 \pm 2,5\%$ com o corante eosina-nigrosina (Bezerra et al., 2023b).

Adicionalmente, algumas sondas fluorescentes têm sido relatadas na avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de aves, dentre as quais se destacam IP, SYBR-14, Hoechst 33342. Estudos já foram relatados utilizando a associação de sondas fluorescentes SYBR-14 e IP para avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides de águias (*Aquila chrysaetos*, *Hieraaetus fasciatus* e *Aquila adalberti*), falcão (*Falco peregrinus*) e grou (*Canadian grus*), obtendo bons resultados de viabilidade em sêmen fresco (Blanco et al., 2000). Recentemente nossa equipe validou o uso dos marcadores IP e Hoechst 33342 para as avaliações dos espermatozoides de emas, sendo observado $65,3 \pm 2,6\%$ de espermatozoides com membranas íntegras nas amostras frescas (Bezerra et al., 2023b).

No que se refere a avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide aviários deve-se atentar para o uso da solução hiposmótica ideal. Pois essa solução deve exercer um estresse osmótico grande o suficiente para causar um aumento observável no volume, mas pequeno o suficiente para impedir a lise da membrana do espermatozoide. Nas emas, nosso grupo testou as osmolaridades de 0, 50, 100, 150 e 200 mOsm/L sendo observado que $77,6 \pm 4,8\%$ dos espermatozoides reagiram ao teste de funcionalidade da membrana com água destilada a 0 mOsm/L (Bezerra et al., 2023b).

Os mamíferos selvagens

Dentre os mamíferos sul-americanos, destacam-se o cateto (*Pecari tajacu*) (Santos et al., 2024), a cutia (*Dasyprocta leporina*) (Castelo et al., 2023), o preá (*Galea spixii*) (Silva et al., 2017), o tatu de seis bandas ou tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*) (Serafim et al., 2010), a onça-pintada (*Panthera onca*) (Silva et al., 2019) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (Matos, 2023), todos eles mamíferos terrestres amplamente distribuídos pelos biomas brasileiros e ocupando uma diversidade de nichos ecológicos. Nestes biomas, algumas dessas espécies apresentam atuações diversas como engenheiros ecológicos, realizando a dispersão de sementes, a aeração do solo (Rodrigues et al., 2019) e o controle de presas (Cavalcanti e Gese, 2019).

Em razão de pressões antrópicas, como a perda de habitat, a fragmentação populacional e a caça ilegal essas espécies sofrem diminuição de sua população (IUCN, 2025). Desse modo, compreender as peculiaridades na avaliação do sêmen dessas espécies é fundamental para o desenvolvimento de técnicas de conservação e reprodução assistida.

Coleta de sêmen e espermatozoides epididimários

Entre os métodos de coleta de sêmen relatados para mamíferos silvestres, destaca-se a eletroejaculação (EEE). Esse método já foi utilizado para coleta do ejaculado de catetos (Santos et al., 2024), gato-do-mato-pequeno (Matos, 2023), tatu de seis bandas (Serafim et al., 2010), dentre outros. No entanto, em cutias (*Dasyprocta leporina*), esse método não obteve sucesso na coleta de ejaculados, tendo apenas a ejaculação de plasma seminal de forma aspérmica (Castelo et al., 2023). Além disso, para coleta de ejaculados também pode ser utilizada a coleta farmacológica que consiste na administração de fármacos que induzem a liberação de espermatozoides na uretra e na coleta por meio de sondagem uretral, esse método já foi utilizado para coleta de espermatozoides ejaculados de onças-pardas com sucesso (Araujo et al., 2020).

Em animais recentemente mortos a recuperação de espermatozoides epididimários é realizada por meio da lavagem retrógrada ou flutuação. A lavagem já foi utilizada para recuperação de espermatozoides de preás (Moreira et al., 2021), cutias (Castelo et al., 2023), catetos (Silva et al., 2023) com sucesso. A flutuação foi descrita em catetos, cutias, preás com sucesso (Silva et al., 2023).

Morfologia espermática

Em preás, Silva et al. (2017), estabeleceram o uso do corante rosa bengala para coloração e análise da morfometria (Tab. 1) e da morfologia das regiões dos espermatozoides de preás. Na Fig. 1 C um espermatozoide de preá é representado.

Nos catetos, Sousa et al. (2013a), testaram diferentes métodos de coloração, como, o azul de bromofenol, a eosina-nigrosina e o rosa bengala, onde o corante rosa bengala foi o mais adequado. Além disso, foi relatada a morfometria (Tab. 1) e a morfologia dos espermatozoides dos catetos. Na Fig. 1 D um espermatozoide de cateto é representado.

Nos tatus de seis bandas, Sousa et al. (2010), testaram diferentes métodos de coloração, como o azul de bromofenol, o panótico rápido®, e o rosa de bengala, onde este último apresentou melhores resultados na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais encontrados. Ademais, foi relatada a morfometria (Tab. 1) e a morfologia dos espermatozoides de tatus de seis bandas, sendo observado um acrossoma em formato de capa ou véu sobre a cabeça do espermatozoide, tendo o segmento equatorial proporcional em comprimento, ao segmento principal do acrossoma e tendo a região pós-acrossômica fina e densa, que está interposta entre a membrana plasmática e o núcleo da célula. Uma cabeça arredondada de grandes dimensões de base mais estreita, uma peça intermediária relativamente atrofiada e cauda de estrutura cônica e delgada na extremidade. Além disso, os espermatozoides se apresentam em forma de roleaux espermático, que consiste em um agrupamento de dois ou mais espermatozoides em uma pilha (Sousa et al., 2013b).

Nas cutias, Dantas et al. (2022a), estabeleceram o uso do corante rosa bengala para coloração e análise da morfometria (Tab. 1) e da morfologia das regiões dos espermatozoides de cutias. Na Fig. 1E, um espermatozoide de cutia é representado.

Na onça pintada, Silva et al. (2019), estabeleceu o uso do corante rosa bengala para coloração e análise da morfometria (Tab. 1) e da morfologia das regiões dos espermatozoides, assim, constatando que os gametas apresentam uma cabeça com formato levemente oval, uma peça intermediária espessa conectada a cabeça pela fossa de implantação e uma cauda filamentar.

Em gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), Matos (2023), estabeleceu o uso do corante rosa bengala para coloração e análise da morfometria (Tab. 1) e da morfologia das regiões dos espermatozoides. Demonstrou-se que os gametas apresentam acrossoma não proeminente com as regiões equatorial e apical bem definidas, uma cabeça de formato oval ligeiramente alongado, uma peça intermediária estreita e bem delimitada que se conecta ao colo espermático e a cauda de formato filamentar.

Parâmetros cinéticos espermáticos

Assim como nas aves, nos mamíferos selvagens a calibração dos sistemas CASAs é um entrave nas avaliações dos parâmetros cinemáticos dos espermatozoides. Além disso, observamos que para os tatus-peba e o tatu-de-rabo-mole (*Cabassous unicinctus*), a elevada viscosidade do sêmen e o *roleaux* dificultam a movimentação individual, resultando na ausência de motilidade progressiva (Sousa et al., 2014).

Diversos estudos têm reportado valores de motilidade espermática em mamíferos silvestres, evidenciando variações entre as espécies. No caso do cateto, observou-se motilidade total de $90,2 \pm 2,4\%$ e motilidade progressiva de $66,2 \pm 5,2\%$ (Santos et al., 2024). Para a cutia, os valores registrados foram $73,3 \pm 6,4\%$ de motilidade total e $13,3 \pm 2,4\%$ de motilidade progressiva (Dantas et al., 2022a). Quanto ao preá, a motilidade total atingiu $88 \pm 3,61\%$, com motilidade progressiva de $15,33 \pm 2,49\%$ (Bezerra, 2024). No caso do tatu de seis bandas ou tatu-peba, foi observada uma motilidade total de $61 \pm 7\%$, sem dados disponíveis para a motilidade progressiva (Serafim et al., 2010). Para a onça-pintada, os valores foram de $93 \pm 1,5\%$ para a motilidade total (Silva et al., 2019). Por fim, para o gato-do-mato-pequeno, foram reportados $55,0 \pm 15,41\%$ de motilidade total (Matos, 2023). É importante ressaltar que os resultados obtidos para os parâmetros seminais podem sofrer alterações por variação individual, técnica de coleta utilizada, protocolo anestésico e variáveis ambientais (Matos, 2023).

Integridade estrutural e funcional da membrana plasmática

Para a análise da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de mamíferos selvagens os relatos apontam o uso de corantes vitais ou sondas fluorescentes.

O corante azul de bromofenol foi utilizado para realizar a análise da integridade de membranas plasmáticas em espermatozoides de diferentes espécies, como, em tatus de seis bandas, no qual foi observado 71,2% de espermatozoides com membranas estruturalmente íntegras (Sousa et al., 2014).

A associação de sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e IP, foi utilizada e estabelecida para avaliação da integridade de membrana plasmática em espermatozoides de diferentes espécies. Nos catetos, foi relatado 92,3 % de espermatozoides com membrana integrais utilizando o CFDA+ IP (Silva et al., 2012).

Outra associação de sondas fluorescentes, o Hoechst 33342 e o IP, também foi utilizada na avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides de mamíferos selvagens. Nos catetos, 83,0 % dos espermatozoides apresentaram-se íntegros (Santos et al., 2024) e nos preás, foi obtido 40,37% de espermatozoides viáveis (Silva et al., 2013).

A funcionalidade da membrana plasmática é avaliada através do teste hiposmótico. Em catetos (*Pecari tajacu*), Santos et al. (2013) realizaram testes de diferentes concentrações de soluções hiposmóticas (0 mOsm, 50 mOsm, 100 mOsm, 150 mOsm e 200 mOsm), demonstrando que a solução de 0 mOsm apresentou uma maior porcentagem de espermatozoides reativos. Em tatus de seis bandas (*Euphractus sexcinctus*), Santos et al. (2011) também realizaram a mesma análise, testando as diferentes soluções hiposmóticas (0 mOsm, 50 mOsm, 100 mOsm e 150 mOsm) e concluindo que a solução de 50 mOsm apresentou maior proporção de espermatozoides reativos, quando comparados às outras soluções, sugerindo-a para uso na espécie. Em cutias (*Dasyprocta leporina*), Dantas et al. em 2022b testaram diferentes concentrações de soluções hiposmóticas (0 mOsm, 50 mOsm e 200 mOsm), também sugerindo que a solução de 50 mOsm apresentou melhores resultados de espermatozoides reativos quando comparados às outras soluções. Nos preás (*Galea spixii*), Silva et al. (2017) utilizaram a solução de 100 mOsm de concentração, como solução para realização do teste de funcionalidade da membrana.

Nos gatos do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), Matos em 2023 utilizou a solução hiposmótica de 0 mOsm de concentração, como solução para realização do teste de funcionalidade da membrana. Já, em onças pintadas, Silva et al. (2019) utilizou a solução hiposmótica de 0 mOsm/L para realização do teste de funcionalidade de membrana, onde obteve 47,1 % de espermatozoides funcionais.

Considerações finais

Em resumo, a análise espermática de zangões enfrenta desafios devido à morfologia específica de seus espermatozoides, exigindo adaptações metodológicas e desenvolvimento de softwares especializados. Ademais, são necessários estudos sobre a fisiologia reprodutiva desses animais, a fim de garantir a conservação e a escolha de características relevantes para a preservação genética e a manutenção da biodiversidade das colônias. Nesse contexto, são essenciais o desenvolvimento de pesquisas, especialmente em relação às abelhas sem ferrão, visando aprimorar protocolos de conservação e a realização de inseminação instrumental para preservar e garantir a reprodução dessas espécies.

Diante da grande diversidade no grupo das aves, é de extrema importância elevar o conhecimento sobre a reprodução dessas espécies. Adaptações nos protocolos de coleta e avaliação do sêmen têm sido desenvolvidas e aplicadas em sua grande maioria nas aves comerciais como galos e perus, devido à maior disponibilidade e interesse econômico, porém, ainda precisamos extrapolar e tentar aprimorar as biotecnologias reprodutivas em aves selvagens e principalmente aquelas ameaçadas de extinção. Essas técnicas beneficiarão não só reprodução para fins comerciais mas também a conservação de espécies ameaçadas de extinção.

Para os mamíferos, observou-se que o uso de biotecnologias reprodutivas tem se desenvolvido de forma consistente, favorecendo iniciativas voltadas à conservação das espécies e à criação de bancos de germoplasma. Métodos de coleta diversos vêm sendo empregados com diferentes graus de eficácia, dependendo da espécie. Paralelamente, os procedimentos de avaliação da qualidade espermática, como a análise morfológica, a motilidade e os testes de integridade e funcionalidade de membrana, permitem caracterizar com maior precisão o potencial de uso dos gametas em técnicas de reprodução assistida.

A principal consideração diante da vastidão de metodologias aplicadas na análise espermática, no entanto, é que o profundo conhecimento da espécie ou grupo de espécies a qual se deseja investigar é essencial. Haja vista a grande biodiversidade nacional, ações mais concretas para se conhecer nossa falta são necessárias para o desenvolvimento de estratégias palpáveis e efetivas para sua conservação.

Referências

- Abrol D. (Ed.). Role of Giant Honeybees in Natural and Agricultural Systems (1st ed.). CRC Press, 2023.
- Al-Daraji HJ, Al-Shemmary SA. Effect of collection method on semen quality of ostrich (*Struthio camelus*). *Res Opin Anim Vet Sci*, v.5, p.108-115, 2005.
- Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, Aktar A, Ustuner B, Yilmaz M, Duman M, Ozkan H, Akkaya Y,

- Sagirkaya H, Nur Z.** Honey Bee Drone (*Apis mellifera*) Sperm Cryopreservation with Rainbow Trout Seminal Plasma Supplemented Extenders. *J Hell Vet Medical Soc*, v.73, p.3751-3756, 2022.
- Araújo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergol LCF, Silva LC, Jorge-Neto PN, Sampaio BFB.** Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae). *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.72, p.437-442, 2020.
- Ascher JS, Pickering J.** Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila), 2014. Disponível em: http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species.
- Bezerra LGP, Silva AM, Jurema AP, Dantas MRT, Pereira AG, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Changes in Sperm Morphology, Morphometry, and Motility from the Epididymis to the Vas Deferens in Rheas (*Rhea americana*, Linnaeus, 1758). *Animals*, v.13, p.1483, 2023a.
- Bezerra GSC.** *Relações entre características de espermatozoides epididimários de preás Galea spixii (Wagler, 1831) e variáveis meteorológicas do período chuvoso no bioma Caatinga*. 2024. 45 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2024.
- Bezerra LGP, Silva AM, Dantas MRT, Santos RPD, Moreira SSJ, Pereira AG, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Development of assays for the characterization of sperm motility parameters, viability, and membrane integrity in the epididymis and vas deferens of the greater rhea (*Rhea americana*). *Anim Reprod*, v.20, 2023b.
- Bird Life International.** State of the World's Birds 2022: Insights and solutions for the biodiversity crisis. BirdLife International: Cambridge, UK; 2022.
- Blanco JM, Wildt DE, Hofle U, Voelker W, Donoghue AM.** 2009. Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology* v.71, p.200-213, 2009.
- Brown ME, Singh RP, Pukazhenth B, Keefer CL, Songsasen N.** Cryopreservation effects on sperm function and fertility in two threatened crane species. *Cryobiology* v.82, p.148-154, 2018.
- Burrows WH, Quinn JP.** A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl." *Poult Sci*, v.14, p.253-254, 1935.
- Cardoso B, Sánchez-Ajofrín I, Castaño C, García-Álvarez O, Estes MC, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Garde JJ, Santiago-Moreno J, Soler AJ.** Optimization of Sperm Cryopreservation Protocol for Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*). *Animals*, v.10, p.691, 2020.
- Castelo TS, Silva AM, Peixoto GCX, Souza ALP, Campos LB, Lima GL, Dantas MRT, Souza-Junior JBF, Silva AR.** Cryopreservation efficiency of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) sperm obtained from different origins through epididymal retrograde flushing or electroejaculation. *Cryobiology*, v.113, 2023.
- Cavalcanti SMC, Gese EM.** Kill rates and predation patterns of jaguars (*Panthera onca*) in the southern Pantanal, Brazil. *J Mammal*, v.91, p.722-736, 2010.
- Cobey S, Tarpy DR, Woyker J.** Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J Apic Res*, v.52, p.1-18, 2013.
- Comizzoli P, Crosier AE, Songsasen N, Gunther MS, Howard JG, Wildt DE.** Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.47-52, 2009.
- Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R.** Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev*, v.40, p.493-504, 2000.
- Comizzoli P.** Biotechnologies for wildlife fertility preservation, *Anim Front*, v.5, p.73-78, 2015
- Dantas MRT, Luz NRN, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Oliveira MF, Silva AR.** Evaluation of sperm membrane functionality during epididymal transit in red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*). *Reprod Domest Anim*, v.57, p.912 - 918. 2022b.
- Dantas MRT, Silva AM, Bezerra LGP, Pereira AG, Luz NRN, Souza-Junior JBF, Oliveira MF, Silva AR.** Morphological, morphometric, ultrastructural, and functional evaluation of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) sperm during epididymal transit. *Anim Reprod Sci*, v.243, 2022a.
- Divasón J, Romero A, Silvestre MA, Santolaria P, Yániz J.** In vitro maintenance of drones and development of new software for sperm quality analysis facilitate the study of honey bee reproductive quality. *J Apic Res*, v.63, p.1088-1095, 2023.
- Frediani MH, Guida FJV, Salgado PAB, Gonçalves RD, Blank MH, Novaes GA, Pereira RJG.** Semen collection by electrostimulation in a variety of bird orders. *Theriogenology*, v.125, p.140-151, 2019.
- Góes PAA, Cavalcante AKS, Nichi M, Perez EGA, Barnabe RC, Barnabe VH.** Reproductive Characteristics of Captive Greater Rhea (*Rhea americana*) Males Reared in the State of São Paulo, Brazil. *Braz J Poult Sci*, v.2, p.57-62, 2010.
- Gulov AN, Bragina YE.** Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis Mellifera* Linnaeus Drones. *Russ Agricult Sci*, v.48, p.512-520, 2022.

- Hermes R, Göritz F, Saragusty J, Sos E, Molnar V, Reid CE, Schwarzenberger F, Hildebrandt TB.** First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros. *Theriogenology*, v.71, p.393-399, 2009.
- Lu JC, Huang YF, Lü NQ.** Computer-aided sperm analysis: Past, present and future. *Andrologia*, v.46, p.329-338, 2014.
- Mahendiran M, Azeez PA.** Ecosystem services of birds: a review of market and non-market values. *Entomol Ornithol Herpetol*, v.7, 2018.
- Matos YG.** *Biometria testicular e caracterização morfológica, morfométrica e ultraestrutural dos espermatozoides de tigrina Leopardus tigrinus (Schreber, 1775) no bioma Caatinga*. 2023.52f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2023.
- Mendes AMC.** Inseminação artificial em abelhas rainhas. *Agroforum*, v.16, p.31-36. 2008.
- Morais LS, Araujo Neto ER, Silva AM, Marinho DEL, Bezerra LGP, Velarde JMDS., Silva AR, Gramacho KP, Message D.** Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga biome. *J Apic Res*, v.63, p.1106-1113, 2022.
- Moreira SSJ, Silva AM, Souza ALP, Praxedes ECG, Souza Junior JBF, Pereira AF, Silva AR.** Cryopreservation of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm using Tris- and coconut water-based extenders supplemented with egg yolk or Aloe vera. *Cryobiology*, v.99, p.40-45, 2021.
- Murray JF., van der Horst G, Allsopp M, Kotzé RCM.** A new fluorescent method to determine honey bee sperm motility parameters with computer-aided sperm analysis. *J Apic Res*, v.62, p.944-952, 2022.
- Peng CYS, Yin CM, Yin LRS.** Ultrastructure of honey-Bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol Entomol*, v.18, p.93-101, 1993.
- Pereira RJG, Blank MH.** Challenges and current developments in the use of assisted reproduction techniques in wild birds. *Rev Bras Reprod Anim* v.41, p.237-24, 2017.
- Rodrigues TF, Mantellatto AMB, Superina M, Chiarello AG.** Ecosystem services provided by armadillos. *Biol Rev*, v.95, p.1-21. 2019.
- Santos EAA, Sousa PC, Dias CEV, Castelo TS, Peixoto GCX, Ricarte ARE, Simão BR, Freitas CIA, Silva AR.** Assessment of sperm survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). *Theriogenology*, v.76, p.623-629, 2011.
- Santos EAA, Sousa PC, Peixoto GCX, Simão BR, Oliveira MF, Silva AR.** Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Arq Bras Med Zootec*, v.65, p.1257-1260, 2013.
- Santos RP, Silva AM, Pereira AG, Cavalcante YCS, Matos YG, Bezerra GSC, Dantas LL, Silva AR.** Effect of Diluents and Storage Time on the Cryopreservation of Collared Peccary (*Pecari tajacu*) Semen after Cooling Storage in a Transport Container at 5° C. *Animals*, v. 4, p.934, 2024.
- Serafim MKB, Lira RA, Costa LLM, Gadelha ICN, Freitas CIA, Silva AR.** Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.362-365, 2010.
- Silva AM, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JAB, Campos LB, Paiva ALC, Paula VV, Silva AR.** Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, v.78, p.605-611, 2012.
- Silva AM, Sousa PC, Bezerra JAB, Santos EAA, Campos LB, Praxedes ECG, Souza ALP, Silva AR.** Validação de sondas moleculares fluorescentes na avaliação da viabilidade de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*). In: XIX Seminário de Iniciação Científica da UFERSA, 2013, Mossoró. Anais Mossoró: UFERSA, 2013. p.158, Resumo.
- Silva AM, Sousa PC, Campos LB, Bezerra JAB, Lago AEA, Oliveira MF, Silva AR.** Comparison of different extenders on the recovery and longevity of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed caviés (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Zygote*, v.25, p.176-182, 2017.
- Silva AM, Santos RP, Matos YG, Silva AR.** Recuperação, caracterização e criopreservação de espermatozoides epididimários de animais silvestres do bioma Caatinga. *Rev Bras Reprod Anim*, v.47, p.171-178, 2023.
- Silva HVR, Nunes TGP, Ribeiro LR, Freitas LA, Oliveira MF, Assis Neto AC, Silva AR, Silva LDM.** Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. *Anim Reprod Sci*, v.203, p.84-93, 2019.
- Smith A, Bonato M, Dzama K, Malecki IA, Cloete S.** Classification of ostrich sperm characteristics. *Anim Reprod Sci*, v.168, p.138-150, 2016.
- Sood S, Malecki IA, Tawang A, Martin GB.** Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm

- preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. *Theriogenology*, v.78, p.1557-1569, 2012.
- Sousa PC, Santos EAA, Castelo TS, Silva AR, Freitas CIA.** Comparação entre diferentes métodos de coloração para análise morfológica de espermatozoides de tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*). In: XVI Encontro de Pesquisa e Extensão - XVI ENCOPE/UERN. Mossoró. 2010. Resumo.
- Sousa PC, Santos EAA, Souza ALP, Lima GL, Barros FFPC, Oliveira MF, Silva AR.** Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Pesq Vet Bras*, v.33, p.924-930, 2013a.
- Sousa PC, Santos EAA, Bezerra JAB, Lima GL, Castelo TS, Fontenele-Neto JD, Silva AR.** Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. *Anim Reprod Sci*, v.140, p.279-285, 2013b.
- Sousa PC, Santos EAA, Silva AM, Castelo TS, Peixoto GCX, Freitas CIA, Silva AR.** Viabilidade do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) centrifugado e diluído em Tris ou água de coco em pó. *Ciência Rural*, v.44, p.1645-1650, 2014.
- Stelzer G, Crosta L, Bürkle M, Krautwald-Junghanns M-E.** Attempted semen collection using the massage technique and semen analysis in various psittacine species. *J Avian Med Surg*, v.19, p.7-13, 2005.
- Stiftung, HB.** Atlas dos Agrotóxicos. Fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura. Rio de Janeiro, 2024. Disponível em: <https://br.boell.org/sites/default/files/2024-05/240416-atlas-do-agrotoxico-2024-segunda-edicao.pdf>.
- Tanga BM, Qamar AY, Raza S, Bang S, Fang X, Yoon K, Cho J.** Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - A review. *Anim Biosci*, v.34, p.1253-1270, 2021.
- Villaverde-Morcillo S, García-Sánchez R, Castaño C, Rodríguez E, Gonzalez F, Estesio M, Santiago-Moreno J.** Characterization of natural ejaculates and sperm cryopreservation in a golden eagle (*Aquila chrysaetus*). *J Zoo Wildl Med*, v.46, p.335-338, 2015.
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder, H.** Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue and Cell*, v.36, p.29-41, 2004.
- IUCN.** The IUCN Red List of Threatened Species, 2025.
- Blanco JM, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM.** Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle and Peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod*, v.63, p.1164-1171, 2000.
- Donoghue AM, Wishart GJ.** Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.213-232, 2000.
- Nur Z, Seven-Cakmak S, Ustuner B, Cakmak I, Erturk M, Abramson CI, Sagirkaya H, Soylu MK.** The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43, 31-38, 2012.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.57, p.1401-1406, 1997.
- Angrimani DSR, Losano JDA, Rui BR, Bicudo LC, Andrade AFC, Arruda RP, Celeghini ECC.** Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.277-283, 2015.
- Kaya A, Uysal O.** In vitro spermatological parameters in drones. *U. Ari. D.-U. Bee J*, v.23, p.268-79, 2023.